

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی قزوین



دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

عنوان پایان نامه:

بررسی بیان یا عدم بیان ژن P62 در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی نژاد ویستار

استاد راهنما: دکتر شهرام دارابی

اساتید مشاور: دکتر فرزاد رجایی

نگارش: مرضیه شمس نورائی

سال تحصیلی ۱۳۹۴-۱۳۹۵

شماره پایان نامه:

تقدیم نامه

تقدیم نامه به پدر و مادر عزیز و مهربانم،

این دو معلم بزرگوارم... که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یآوری بی چشم داشت برای من بوده اند.

سپاس نامه

نگارنده بر خود لازم می داند از زحمات اساتید و دانشجویان صمیمی گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به خصوص اساتید ارجمند جناب آقای دکتر شهرام دارابی و جناب آقای دکتر فرزاد رجایی که با راهنمایی های خود راه گشای اینجانب بوده اند، قدردانی و تشکر نماید.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	۱
۱-۱. مقدمه	۳
۲-۱. بیان موضوع	۷
۳-۱. اهداف و فرضیات	۹
۳-۱-۱. هدف اصلی طرح	۹
۳-۳-۱. اهداف فرعی	۹
۳-۳-۱. اهداف کاربردی	۹
۴-۱. محدودیت‌های تحقیق	۱۰
۵-۱. کلیات	۱۱
۵-۱-۱. بیماری پارکینسون	۱۱
۵-۱-۱-۱. اتیولوژی	۱۱
۵-۱-۱-۲. پاتوژنز	۱۲
۵-۱-۱-۳. پاتولوژی	۱۸
۵-۱-۱-۴. تظاهرات بالینی	۱۹
۵-۱-۱-۵. تشخیص بیماری پارکینسون	۲۱
۵-۱-۱-۶. درمان	۲۲
۵-۲. عقده‌های قاعده ای	۲۴
۵-۲-۱. استریاتوم	۲۶
۵-۲-۲. جسم سیاه	۲۸
۵-۲-۳. گلوبوس پالیدوس	۲۹
۵-۲-۴. نوروترانسمیترها	۳۰
۵-۳. مدل تجربی بیماری پارکینسون	۳۱

۳۲	۴-۵-۱. مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون.....
۳۴	۶-۴-۵-۱. مدل ۶- هیدروکسی دوپامین.....
۳۶	۶-۵-۱. تغییرات رفتاری بعد از تزریق یکطرفه 6-OHDA.....
۳۶	۷-۵-۱. تغییرات ساختمانی و بیوشیمیایی پس از تخریب یکطرفه با ۶ هیدروکسی دوپامین.....
۳۷	۶-۱. اتوفاژی.....
۳۸	۱-۶-۱. اتوفاژی مکانیسمی در هموستاز سلولی.....
۳۹	۱-۶-۱.۱. القاء اتوفاژی از طریق کمپلکس ULK1 و mTOR.....
۴۰	۲-۱-۶-۱. کمپلکس Class III PI3K در هسته اتوفاگوزوم.....
۴۱	۳-۱-۶-۱. سیستم‌های کونژوگه در گسترش غشاهای اتوفاگوزوم.....
۴۴	۲-۶-۱. تنظیم اتوفاژی در بیماری پارکینسون.....
۴۶	۳-۶-۱. ژن‌های اتوفاژی.....
۵۳	۱-۲. بررسی متون.....
۶۲	۱-۳.۱. ابزار و مواد.....
۶۲	۱-۳.۱.۱. ابزار آلات.....
۶۲	۲-۱-۳. مواد لازم.....
۶۲	۲-۳. گروه‌های مورد بررسی.....
۶۳	۳-۳. ارزیابی رفتاری قبل از آزمایش.....
۶۴	۴-۳. جراحی.....
۷۰	۵-۳. بررسی بیان ژن به وسیله واکنش پلیمراز معکوس (RT-PCR).....
۷۸	نتایج.....
۷۹	۱-۴. بررسی رفتار چرخشی.....
۸۱	۲-۴. بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR.....

۵-۱. بحث..... ۸۴

۵-۲. نتیجه گیری ۹۰

۵-۳. پیشنهادات ۹۱

منابع ۹۵

چکیده انگلیسی ۱۰۲

چکیده

مقدمه: بیماری پارکینسون در انسان با تحلیل پیشرونده و وسیع نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه همراه می باشد. براساس شواهد متعدد، استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد این بیماری دارد. استرس اکسیداتیو باعث تخریب ارگانل ها می شود و اتوفاژی مکانیسمی می باشد که ارگانل های آسیب دیده را از سلول برداشت می کند. این تحقیق به منظور تعیین بیان ژن P62 موثر در اتوفاژی و ژن های این مسیر سیگنالینگ سلولی شامل Atg5، Atg12، Atg16L1، Atg10، GAPDH، LC3 در بیماری پارکینسون در مدل حیوانی می باشد.

روش انجام کار: موش های صحرایی نژاد ویستار به سه گروه کنترل، شاهد و تخریب تقسیم شدند و به وسیله تزریق OHDA- ۶ در استریاتوم چپ پارکینسونی گردیدند. تست رفتاری یک هفته قبل از جراحی (base line) و چهار هفته بعد از جراحی به وسیله آپومورفین انجام شد. پس از تأیید مدل بیماری، جسم سیاه واقع در ساقه مغز حیوانات به منظور انجام RT-PCR بر روی ژن های P62، Atg5، Atg10، Atg12، Atg16L1، LC3 و GAPDH خارج گردید.

نتایج: در تست رفتاری، میانگین چرخش حیوانات ۱۳۲/۷۵ بود که بیانگر ایجاد صحیح مدل بیماری بود. ژن های Atg5، Atg12، LC3، GAPDH، P62 بیان شدند و Atg10 و Atg16L1 بیان نشدند.

واژه های کلیدی: بیماری پارکینسون، اتوفاژی، استرس اکسیداتیو، ۶ هیدروکسی دوپامین، موش صحرایی، آپومورفین

فصل اول

مقدمه

۱-۱. مقدمه

بیماری پارکینسون^۱ دومین اختلال نورودژنراتیو رایج بعد از بیماری آلزایمر می‌باشد. بیماری پارکینسون ۱-۲٪ افراد بالای ۶۵ ساله را درگیر می‌کند. علائم حرکتی این بیماری شامل: لرزش، سفت شدگی عضلات، برادی کینز (آهستگی حرکات) و اختلال در راه رفتن می‌باشد. چند علامت غیر حرکتی پارکینسون نارسایی اتونومیک، اختلال افسردگی، اختلال بویایی، سایکوزو آشفتگی در خواب می‌باشد [۱]. بیماری پارکینسون در ۹۰٪ موارد بدون علت می‌باشد. اگر چه ریسک فاکتورهای محیطی در آن دخیل می‌باشد. ریسک فاکتورهای محیطی مطرح شده برای بیماری پارکینسون شامل صنعتی شدن، زندگی روستایی، در معرض فلزات سنگین و علف کش‌ها قرار گرفتن می‌باشد. مطالعه روی دوقلوها از علت ژنتیک در شروع این بیماری در سنین بالاتر خبر می‌دهد [۲]. براساس مطالعات اپیدمیولوژیکی سن مهمترین ریسک فاکتور در پیشرفت بیماری پارکینسون می‌باشد [۳].

مکانیسم ایجاد بیماری پارکینسون پیچیده است. فقدان نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه مسئول ایجاد علائم حرکتی بیماری پارکینسون می‌باشد [۴]. مدارک نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد میتوکندری، تجمع پروتئین‌ها و استرس اتوفاژیک در تخریب نورون‌های دوپامینرژیک و پاتوژنیز بیماری‌های نورودژنراتیو موثر می‌باشند [۵]. بیماری پارکینسون با تجمع پروتئین آلفا-سینوکلئین^۲ که جزئی از محتوای اجسام لوئی^۳ می‌باشد شناخته می‌شود که در پاتوژنز این بیماری موثر می‌باشد. درمان محافظت کننده در برابر فقدان نورون‌ها در حال حاضر وجود ندارد. ورزش به طور کلی ایمن و بدون هزینه

¹ Parkinson's disease

² alpha- synuclein

³ lewy body

می‌باشد و به عنوان درمان علائم حرکتی این بیماری به شمار می‌رود. بیماری پارکینسون عمدتاً با لوودوپا^۱ که جایگزین فقدان دوپامین است درمان می‌شود [۶].

Rachel Denyer و همکاران در سال ۲۰۱۲ دریافتند از ژن درمانی برای حفاظت از نورون‌های دوپامینرژیک که تحت تاثیر بیماری پارکینسون قرار گرفته اند و همچنین برای افزایش آنزیم‌هایی که در سنتز دوپامین شرکت می‌کنند می‌توان استفاده کرد [۷].

اتوفاژی^۲ یک فرآیند فیزیولوژیکی است که نقش مهمی در هومئوستازی سلول از طریق هضم پروتئین‌ها و ارگانل‌های آسیب دیده دارد. اتوفاژی (به زبان یونانی خود خواری) فرآیندی برای کنترل میزان و کیفیت محتویات سیتوپلاسمی در سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتیک است که شامل تخریب و هضم پروتئین‌های آسیب دیده یا بد شکل گرفته و ارگانل‌های طویل‌العمری چون میتوکندری و پراکسی‌زوم می‌باشد. اتوفاژی نقش مهمی را در تکامل و تمایز سلولی به عهده دارد و اختلال در اتوفاژی باعث پیری و بیماری‌های نورو دژنراتیو مانند آلزایمر، پارکینسون و بیماری هانتینگتون می‌شود [۷].

Mizushima و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند که اختلال در مسیر اتوفاژی و تغییر در ژن‌های وابسته به اتوفاژی در ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو و انواع مختلف سرطان‌ها موثر می‌باشد [۸].

مواجهه با عواملی چون آلاینده‌های محیطی، داروها و سموم سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و عدم تعادل بین تولید رادیکال‌ها و اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی گردیده و حالتی به نام استرس اکسیداتیو^۳ به وجود می‌آورد که منجر به آسیب بافتی می‌شود. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد. میتوفاژی (اتوفاژی

^۱ L-dopa

^۲ Autophagy

^۳ stress oxidative

میتوکندری) نقش مهمی در حفظ حیات سلول دارد که این کار را با جلوگیری از تجمع میتوکندری‌های آسیب دیده که منجر به تخریب سلول می شود انجام می‌دهد[۹].

تاکنون بسیاری از ژن‌های مرتبط با اتوفاژی شناخته شده اند و جهش در برخی از آن‌ها با بیماری پارکینسون در ارتباط است. اخیراً تعدادی مطالعه مبنی بر دخالت دو پروتئین Parkin و PINK^۱ و جهش جهش در آن‌ها در ایجاد بیماری پارکینسون موثر می‌باشد [۱۰]. شناسایی ژن‌های اتوفاژی در بررسی ارتباط این ژن‌ها در بروز بیماری پارکینسون مهم است. از جمله این ژن‌های اتوفاژی P62 می‌باشد که ارتباط آن با بیماری پارکینسون بررسی می‌شود.

P62 یک پروتئین داربست با چندین بخش می باشد که عملکرد آن در انتقال سیگنال، تکثیر بقای سلول، مرگ، تورم، تشکیل تومور و در پاسخ به استرس اکسیداتیو می‌باشد. مطالعات اتوفاژی اخیر نشان داده است که P62 جزئی از اتوفاژی است که به عنوان گیرنده اتوفاژی برای پروتئین‌های تجمع یافته، ارگانل‌های آسیب دیده و همچنین برای میکرومها می‌باشد. P62 در شرایط فیزیولوژیکی نقش مهمی در حفظ هموستاز متابولیک دارد که اساس آن بر روی موش‌های (knock out) می‌باشد [۱۱]. P62 باعث القاء اکسیداتیو در انسان و موش می‌شود که در ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو موثر می‌باشد [۱۲].

Atg5^۲ در اتوفاژی در شگل‌گیری اتوفاگوزوم ضروری است. اولین سیستم کونزوگه یوبیکوئیتین Atg5-Atg12-Atg16L1 می‌باشد که برای شکل‌گیری اتوفاگوزوم اولیه ضروری می باشد [۱۳].

Atg12 یک پروتئین با ۱۸۶ آمینواسید است که با Atg5 کونزوگه می‌شود. گلايسين در زنجيره انتهایی کربوکسی Atg12 به وسیله (E1 Like protein) Atg7 از طریق پیوند پر انرژی وابسته به ATP فعال می‌شود. Atg12 به Atg10(E2Like protein) منتقل می‌شود و به لیزین ۱۴۹ Atg5 متصل

^۱ PTEN-induced putative kinase 1

^۲Autophagy-related protein

می‌شود. کونژوگه Atg5-Atg12 برای شکل‌گیری کمپلکس Atg5-Atg16-Atg12 با Atg16L1 تعامل می‌کند [۱۳]. کمپلکس Atg5-Atg12-Atg16 در تشکیل اتوفاگوزوم دخالت دارد [۱۴].

LC3^۱ برای فرآیند اتوفاژی ضروری هستند و در مراحل اولیه بیوسنتز اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. دومین سیستم کونژوگه، تغییردر LC3 به وسیله فسفولیپید فسفاتیدیل اتانول آمین یک فرآیند اساسی در شکل‌گیری اتوفاگوزوم است. LC3 به وسیله Atg4 سیستئین پروتئاز شکسته می‌شود و با PE^۲ به وسیله Atg3 و Atg7 کونژوگه می‌شود. LC3II همراه با لیپید در شکل‌گیری غشاهای اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. تبدیل LC3 به LC3 II به عنوان نشانه‌ای در القاء اتوفاژی می‌باشد [۱۵].

^۳ GAPDH در اتوفاژی سلول از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو شرکت می‌کند. GAPDH شانس بقای سلول را با افزایش گلیکولیز بالا می‌برد. GAPDH بیان ژن‌های دخالت‌کننده در اتوفاژی برای مثال Atg12 را به صورت مستقیم یا غیر مستقیم افزایش می‌دهد [۱۶].

Atg 10 یک آنزیم شبیه E2 است که در شکل‌گیری اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. Atg 10 با Atg 7 برای دریافت Atg12 که یک مولکول یوبیکوئیتین است تعامل می‌کند که در واکنش کونژوگه-Atg5-Atg12 شرکت می‌کند و در شکل‌گیری اتوفاگوزوم دخالت می‌کند [۱۷].

تمام ژن‌های توضیح داده شده، ژن‌های اتوفاژی هستند. هدف بررسی ارتباط این ژن‌ها با بیماری پارکینسون می‌باشد و اینکه آیا P62 در بیماری پارکینسون بیان می‌شود یا نه و در صورت بیان شدن آیا مسیر اتوفاژی و در کنار آن آبشار ژن‌های اتوفاژی بیان می‌شوند یا نه را مورد بررسی قرار گرفت.

^۱ Microtubule-Associated protein 1A/1B light chain 3

^۲ phosphatidylethanolamine

^۳ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

۱-۲. بیان موضوع

در طی دو دهه ی اخیر پیشرفت های زیادی در جهت شناخت پاتوژن بیماری پارکینسون انجام شده که نتیجه آن کشف جهش های ژنی است که در شروع بیماری پارکینسون دخالت دارد. اخیرا اختلال در مسیر اتوفاژی در مغز بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون و مدل های حیوانی بیماری پارکینسون مشاهده شده است که نقش اتوفاژی را در بیماری پارکینسون نشان می دهد. در واقع اتوفاژی در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری های نورودژنراتیو دخیل می باشد. مطالعات نشان می دهد که استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد میتوکندی، تجمع پروتئین ها و استرس اتوفاژیک در تخریب نورون های دوپامینرژیک و پاتوژنیز بیماری های نورودژنراتیو موثر می باشند [۵].

ژن P62 و ژن های مرتبط با آن LC3،GAPDH،Atg16L1،Atg10،Atg5،Atg12 در اتوفاژی شرکت می کنند در نتیجه می توانند با بیماری پارکینسون در ارتباط باشند [۱۱، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴]. اخیرا تعدادی مطالعه مبنی بر دخالت دو پروتئین Parkin و PINK1 و جهش در آنها در ایجاد بیماری پارکینسون موثر می باشد [۱۰].

با توجه به مطالب بیان شده، ارتباط ژن های P62،Atg10،LC3،Atg16L،Atg12،Atg5 و GAPDH را با بیماری پارکینسون از طریق ایجاد مدل یکطرفه و اولیه ی این بیماری در موش صحرایی نژاد ویستار از طریق روش RT-PCR بررسی گردید. در این رابطه، بعد از ایجاد مدل یکطرفه پارکینسون در موش صحرایی از طریق تخریب استریاتوم با نوروتوکسین OHDA-^{۱۶}، رفتار حرکتی چرخشی حیوان به دنبال تجویز سیستمیک آگونیست دوپامینرژیکی آپومورفین به منظور اثبات ایجاد پارکینسون در این

^۱ 6-hydroxydopamine

موش‌ها بررسی شد و سپس استخراج RNA از جسم سیاه، تبدیل آن به ¹CDNA و تکثیر ژن‌های نامبرده توسط RT-PCR² به منظور تعیین بیان ژن‌های نام برده انجام شد.

¹ Complementary DNA

² Reverse transcription polymerase chain reaction

۱-۳. اهداف و فرضیات

۱-۳-۱. هدف اصلی طرح

بررسی بیان یا عدم بیان ژن p62 در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی نژاد ویستار

۱-۳-۲. اهداف فرعی

۱-۳-۲-۱. بررسی بیان ژن LC3 موثر در مسیر اتوفاژی در بیماری پارکینسون

۱-۳-۲-۲. بررسی بیان ژن Atg5 موثر در مسیر اتوفاژی در بیماری پارکینسون

۱-۳-۲-۳. بررسی بیان ژن Atg10 موثر در مسیر اتوفاژی در بیماری پارکینسون

۱-۳-۲-۴. بررسی بیان ژن Atg12 موثر در مسیر اتوفاژی در بیماری پارکینسون

۱-۳-۲-۵. بررسی بیان ژن Atg16L1 موثر در مسیر اتوفاژی در بیماری پارکینسون

۱-۳-۲-۶. بررسی بیان ژن GAPDH موثر در مسیر اتوفاژی در بیماری پارکینسون

۱-۳-۳. اهداف کاربردی

در صورت مثبت بودن نتایج تکرار آزمایش در دیگر مدل های حیوانی پارکینسون توصیه می گردد.

۱-۳-۴. فرضیه ها یا سوال های پژوهش:

۱- آیا در بیماری پارکینسون مسیر سلولی اتوفاژی فعال می شود؟

۲- آیا در بیماری پارکینسون ژن P62 بیان می شود؟

۳- آیا در بیماری پارکینسون ژن GAPDH بیان می شود؟

۴- آیا در بیماری پارکینسون ژن Atg 5 بیان می شود ؟

۵- آیا در بیماری پارکینسون ژن Atg10 بیان می شود ؟

۶- آیا در بیماری پارکینسون ژن Atg12 بیان می شود؟

۷- آیا در بیماری پارکینسون ژن Atg16L1 بیان می شود؟

۸- آیا در بیماری پارکینسون ژن LC3 بیان می شود؟

۴-۱. محدودیتهای تحقیق

۱-۴-۱. موجود نبودن مواد اولیه تحقیق ۶- هیدروکسی دوپامین ، آپومورفین هیدروکلراید و کیت

CDNA در داخل کشور و ائتلاف وقت زیادی جهت تهیه این مواد از خارج کشور

۱-۴-۲. نبودن دستگاه استریو تاکس، ترمو بلاک، دستگاه شیکر، hot plate و Thermal cycler در

آزمایشگاه گروه آناتومی و اجبار به استفاده از آن ها در سایر گروه ها

۱-۴-۳. نداشتن مسئول و رعایت نشدن بهداشت حیوان ها در حیوان خانه

۱-۵. کلیات

۱-۵-۱. بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون دومین اختلال رایج نورودژنراتیو می‌باشد. بیش از ۱٪ جمعیت بالای ۶۵ سال و بیش از ۴٪ جمعیت بالای ۸۵ سال دچار بیماری پارکینسون می‌شود. در جوامع مختلف شیوع مشابه دارد. در این بیماری به طور انتخابی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بعد از اینکه ۵۰٪ نورون‌های دوپامینرژیک و ۷۵-۸۰٪ دوپامین استریاتال دژنره شدند علائم بیماری آشکار می‌شود. علائم حرکتی آن شامل لرزش، سفتی، کندی و بی ثباتی حرکتی می‌باشد. چندین خصوصیت نوروموتور شامل نارسایی اتونومیک آسیب‌های شناختی، افسردگی، اختلالات بویایی، جنون و اختلالات خواب در بیماران پارکینسونی شایع می‌باشد [۱۸، ۱۹، ۲۰].

۱-۵-۱-۱. اتیولوژی

اگرچه علت بیماری پارکینسون هنوز مشخص نیست. دراکثر موارد ترکیبی از ریسک فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در ایجاد بیماری پارکینسون دخالت دارد.

۱-۵-۱-۱-۱. عوامل خطر زیست محیطی معمولاً با توسعه بیماری پارکینسون هستند عبارتند از استفاده از آفت‌کش‌ها، زندگی در یک محیط روستایی، مصرف آب چاه، قرار گرفتن در معرض علف‌کش‌ها و نزدیکی به کارخانه‌های صنعتی و یا معادن [۲۱].

۱-۵-۱-۱-۲. موسسه ملی بهداشت و درمان نشان داد که مصرف کافئین بالاتر با کاهش خطر ابتلا به بیماری پارکینسون در هر دو مردان و زنان همراه بود. ارتباط مشابهی را برای مصرف سیگار و خطر بیماری پارکینسون شده است. مکانیسم‌های بیولوژیکی اساسی رابطه معکوس بین کافئین و سیگار کشیدن و خطر بیماری پارکینسون به خوبی مشخص نشده است [۲۲].

۳-۱-۱-۵-۱. بعضی از داروها مانند متوکلوپرامید، فنوتیازین ها، رزپرین، تترابنازین، بوتیروفنون ها

باعث ایجاد بیماری پارکینسون برگشت پذیر می شوند.

۴-۱-۱-۵-۱. MPTP^۱: بیمارانی که ترکیب مشابه مپریدین مصرف نموده اند پارکینسون گزارش شده

است. این ماده نورون های دوپامینی را تخریب می کند و باعث ایجاد بیماری پارکینسون می شود. در این بیماران کندی، سفتی، و لرزش پیشرفت می کند و با درمان جایگزینی دوپامین بهبود می یابد. MPTP از سد خونی و مغزی عبور می کند و به MPP⁺ اکسید می شود. MPP⁺ در میتوکندری تجمع می یابد و در عملکرد زنجیره تنفسی تداخل ایجاد می کند. شباهت شیمیایی بین MPTP و برخی از علف کش ها و آفت کش ها پیشنهاد می شود که سموم مانند MPTP ممکن است یک علت بیماری پارکینسون باشد [۲۳].

۵-۱-۱-۵-۱. ژنتیک: در حال حاضر علل ژنتیکی بیماری پارکینسون برای حدود ۱۰٪ از موارد

شناخته شده است. موتاسیون در ژن a- سینولکئین باعث ایجاد بیماری پارکینسون ارثی اتوزومال غالب می شود. موتاسیون در ژن پارکین باعث ایجاد بیماری پارکینسون ارثی اتوزومال مغلوب می شود [۲۴]. اخیراً تعدادی مطالعه مبنی بر دخالت دو پروتئین Parkin و PINK1 و جهش در آنها در ایجاد بیماری پارکینسون موثر می باشد [۱۰].

۲-۱-۵-۱. پاتوژنز

دو فرضیه در مورد پاتوژنز بیماری پارکینسون وجود دارد. یک فرضیه بیان می کند که تاخوردن نادرست و انباشتگی پروتئین ها در مرگ نورون های دوپامینرژیک نقش دارند و فرضیه دوم بیان می کند که عامل اصلی، نقص عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو متعاقب است.

^۱ 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

۱-۵-۱-۲-۱. تاخوردن نامناسب و انباشتگی پروتئین ها:

پروتئین‌هایی که تاخوردگی نامناسب پیدا کرده اند، به دو صورت محلول و غیر محلول وجود دارند و می‌توانند از طریق مکانیسم‌های متعددی، نورو توکسیک می باشد. انباشتگی پروتئین‌ها می‌توانند مستقیماً آسیب ایجاد کند، احتمالاً از طریق تغییر شکل سلول یا تداخل با انتقال پیام‌های عصبی، بیمارانی که پارکینسون غیر توارثی دارند، به نظر می‌رسد که جهش‌های پاتوژنیک می‌تواند مستقیماً از طریق ایجاد ساختارهای غیر پروتئینی غیر نرمال و به طور غیرمستقیم با تداخل در فرآیندهای که تاخوردگی نادرست پروتئین‌ها را شناسایی می‌کنند، ایجاد بیماری می‌کند.

۱-۵-۱-۲-۲. استرس اکسیداتیو

۱-۵-۱-۲-۲-۱. پروسه تولید استرس اکسیداتیو در مغز

رادیکال‌های آزاد در طول جذب نرمال اکسیژن، عفونت و متابولیسم اکسیداتیو نرمال سوبستراهای معین تولید می‌شوند. در طول تنفس هوایی نرمال سلول عصبی موش صحرایی در حدود 10^{12} مولکول اکسیژن توسط میتوکندری پروسه شده و با حل کردن آن‌ها در آب، آن‌ها را کاهش می‌دهند. در طول این پروسه O_2^- ، H_2O_2 ، OH^- تولید می‌شوند. همچنین در هنگام عفونت باکتریایی یا ویروسی، سلول‌های فاگوسیتوز سطح بالایی از NO ، O_2 ، H_2O_2 به منظور کشتن عوامل عفونی تولید می‌کند. به هر حال این رادیکال‌ها می‌توانند به سلول‌های نرمال هم آسیب برسانند.

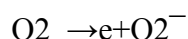
در طی تولید اسیدهای چرب و دیگر مولکول‌ها به وسیله پراکسی زوم، H_2O_2 به عنوان یک محصول فرعی تولید می‌شود. بعضی آنزیم‌ها مانند مونوآمینواکسیداز^۱، تیروزین هیدروکسیلاز و L-amino اسید اکسیداز، H_2O_2 را به عنوان محصول فرعی تولید می‌کنند. همچنین عوامل خارجی می‌توانند استرس

^۱ MAO(Monoamineoxidase)

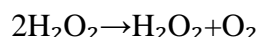
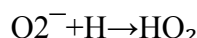
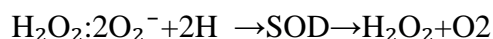
اکسیداتیو را افزایش دهد. هر دو قطعات اکسیژن فعال^۱ و قطعات نیتروژن فعال^۲ در نورودژنراسیون مغزی شرکت می کنند.

۱-۵-۱-۲-۲-۲-۲. مولکول های فعال اکسیژن

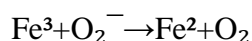
اکسیژن مورد استفاده مغز در هر دقیقه ۳/۵ ml در هر ۱۰۰ gr می باشد. در حدود ۲ درصد اکسیژن مصرفی تبدیل به مولکول های فعال اکسیژن می شود. هنگامی که مولکول اکسیژن O₂ یک الکترون به دست می آورد و تشکیل یون سوپر اکسیداز O₂⁻ را می دهد.



سوپر اکسیداز دیس موتاز^۳ و H می تواند با O₂⁻ واکنش داده و تشکیل هیدروژن پراکسیداز را بدهد.



هر دو شکل فریک و فروس آهن می تواند با یون سوپر اکسیداز و هیدروژن پراکسیداز واکنش داده و تولید مولکول اکسیژن و رادیکال هیدروکسیلاز OH را دهد.



۱-۵-۱-۲-۲-۲. آسیب پذیری جسم سیاه در مقابل استرس اکسیداتیو

رادیکال های آزاد از جمله رادیکال های هیدروکسیل، سوپر اکسید و نیتریک اکسیدولپید پراکسیل اتم ها یا مولکول هایی هستند که به خاطر داشتن الکترون آزاد دائما در بدن موجودات در گردش بوده و بسیار واکنش پذیرند و آسیب های فراوانی به ماکرومولکول های بدن جانداران از جمله DNA، پروتئین ها،

¹ Reactive oxygen species

² Reactive nitrogen species

³ Superoxidase dismutase

لیپیدها و کربو هیدرات‌ها وارد می‌سازند. به عبارت دیگر رادیکال‌های آزاد موجب آسیب اکسیداتیو اسیدنوکلیئیک، پروتئین‌ها و لیپید گردیده و باعث پراکسیداسیون چربی‌های غیر اشباع در غشای‌های سلولی، افزایش نفوذ پذیری عروق ریز، ایجاد ادم و اختلال در عملکرد میتوکندری و.... می‌شوند و لذا بالقوه سمی هستند.

در بدن سیستم‌های خاص برای مقابله با آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد وجود دارد که به سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی معروف است. در حالت عادی بین تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی توازن برقرار است اما مواجهه با عواملی چون آلاینده‌های محیطی، داروها و سموم سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و عدم تعادل بین تولید رادیکال‌ها و اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی گردیده و حالتی به نام استرس اکسیداتیو به وجود می‌آورد که منجر به آسیب بافتی می‌شود.

دلایل متعددی دال بر حساس بودن بافت مغز به واکنش‌های اکسیداتیو وجود دارد:

۱- داشتن غلاف میلین نورون‌ها که در آن غلظت بالایی از لیپیدها اشباع نشده وجود دارد. این لیپیدها هدف اولیه حملات اکسیداتیو می‌باشند.

۲- بافت مغز درصد بالایی از کل اکسیژن بدن را دریافت می‌کند [۲۵].

۳- سیستم عصبی مرکزی تقریباً فاقد مکانیسم‌های دفاعی قوی بر علیه واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشد. به این دلیل است که مغز دارای مقادیر بسیار کم از کاتالاز بوده و میزان گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز در مقایسه با بافت کبد بسیار کمتر می‌باشند.

۴- آهن با غلظت بالا در برخی نواحی مغز یافت می‌شود.

در بیماری پارکینسون سطح گلوتاتیون کاهش می‌یابد هرچند این احتمال وجود دارد که کاهش گلوتاتیون نتیجه تخریب نورونی می‌باشد. در این رابطه یک همبستگی مثبت بین میزان از دست رفتن نورونی و کاهش ذخایر گلوتاتیون وجود دارد. کاهش دسترس بودن گلوتاتیون احیا شده، توانایی نورون‌ها را جهت سم زدایی آب اکسیژنه شدیداً تقلیل داده و میزان تشکیل رادیکال آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش می‌دهد.

عامل دیگر که منجر به تشدید استرس اکسیداتیو می‌گردد، تجمع آهن و سیدروز پیشرونده در جسم سیاه است [۲۵]. گزارشات متعددی مبنی بر این موضوع یافت می‌شود که سطح آهن مغز در بیماران مبتلا به پارکینسون افزایش می‌یابد. در این رابطه مشخص شده است که میزان آهن در ناحیه جسم سیاه زیاد می‌باشد. با افزایش غلظت آهن، افزایش متناسب در اکسیداسیون آنزیمی و یا اتواکسیداسیون دوپامین در جسم سیاه نیز رخ می‌دهد.

تعداد نورون‌های دوپامینرژیک نیگرواستریاتال با پیر شدن فرد، کاهش می‌یابد هر چند این روند در بیماران پارکینسونی با سرعت بیشتری رخ می‌دهد. با افزایش سن فعالیت آنزیم مونوآمینواکسیداز B زیاد می‌شود که این خود با افزایش دادن سرعت تجزیه دوپامین منجر به کاهش غلظت دوپامین در نواحی هدف گردیده و تولید آب اکسیژنه و رادیکال‌های خطرناک هیدروکسیل را تشدید می‌کند [۲۶].

افزایش میزان سنتز دوپامین در نورون‌های دوپامینرژیک باقیمانده از آسیب دژنراتیو خود موجب وارد آمدن استرس اکسیداتیو به این سلول‌ها می‌گردد. منشا دیگر رادیکال‌های آزاد در جسم سیاه تجزیه اکسیداتیو دوپامین توسط آنزیم مونوآمینواکسیداز B می‌باشد. مشخصه بارز بیماری پارکینسون کاهش شدید دوپامین در تمامی بخش‌های عقده‌های قاعده‌ای می‌باشد یعنی مقدار دوپامین و متابولیت‌های آن در هسته‌های دم دار، پوتامن، گلوبوس پالیدوس و در بخش متراکم جسم سیاه شدیداً کاهش می‌یابد.

در طی مراحل اولیه بیماری یک افزایش جبرانی در تراکم گیرنده‌های دوپامینی رخ می‌دهد که این تا حدودی می‌تواند از دست رفتن نورون‌های دوپامینرژیک را جبران کند. با ادامه پیشرفت روند بیماری، تراکم گیرنده‌های دوپامینی کاهش می‌یابد. در نورون‌های باقیمانده فرد مبتلا، تجزیه و متابولیسم دوپامین شدیداً بالا می‌رود که نشانه بیوشیمیایی آن افزایش غلظت یکی از متابولیت‌های دوپامین به نام همووانیلیک در پایانه‌های عصبی در استریاتوم و در اجسام سلولی و در دندریت‌های واقع در جسم سیاه می‌باشد که نتیجه نهایی این وقایع افزایش شدید تولید رادیکال آزاد می‌باشد. با افزایش تولید رادیکال آزاد ناشی از افزایش متابولیسم دوپامین توسط آنزیم‌های حذف کننده اصلی شامل سوپراکسید دیس موتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز مقابله نشود افزایش فعالیت جبرانی نورون‌های باقیمانده مخرب خواهد بود. به همین دلیل تجویز دراز مدت لوودوپا می‌تواند موجب تشدید تولید رادیکال آزاد در بیماران مبتلا گردد [۲۵].

به دلیل غنی بودن سیستم عصبی مرکزی از لیپید، مصرف اکسیژن زیاد و پایین بودن آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، سیستم عصبی مرکزی حساسیت بالایی نسبت به استرس اکسیداتیو دارد به ویژه هیپوکمپ، جسم سیاه و جسم مخطط از حساس ترین بخش‌ها نسبت به استرس اکسیداتیو هستند. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد.

مطالعات نشان داده است که صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در تخریب نورون‌های جسم سیاه دارد. به علت آنکه متابولیسم دوپامین در نورون‌ها با تولید قطعات اکسیژن فعال از جمله پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل همراه می‌باشد. بنابراین نورون‌های دوپامینرژیک در مغز بیشتر در معرض مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند [۲۷].

۱-۵-۱-۲-۳ اختلال در عملکرد میتوکندری (میتوفاژی)^۱

میتوکندری ارگانل مهمی در تولید انرژی در تمام یوکاریوت ها از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو می باشد. میتوکندری منبع اکسیژن فعال سلول می باشد. سطح نرمال اکسیژن فعال در سلول به عنوان آنتی اکسیدانت سلول تحمل می شود. در موقعیت های پاتولوژیکی مقدار تولید قطعات اکسیژن فعال افزایش می یابد و باعث تخریب محتویات سیتوپلاسم از جمله میتوکندری می باشد. میتوکندری در سلول، هدف اصلی قطعات اکسیژن فعال می باشد و این ماده با صدمه به غشای میتوکندری موجب مرگ نورون ها می شود. تجمع محتویات آسیب دیده باعث پیری، سرطان و بیماری های نورودژنراتیو مانند پارکینسون می شود. مطالعات اخیر نشان داده است که اختلال در عملکرد میتوکندری در ایجاد بیماری پارکینسون ارثی و تک گیر نقش دارد. اختلال در عملکرد میتوکندری نتیجه نقص در زنجیره انتقال الکترون کمپلکس I میتوکندریایی می باشد. برخی از مطالعات نشان داده است که فعالیت های کمپلکس I میتوکندریایی در ساب نیگرواستریاتال بیماران پارکینسونی بعد از مرگ کاهش یافته است. چندین مطالعه نشان داده است که افزایش آسیب سلولی از طریق رادیکال های آزاد و تخلیه ATP سلولی در مرگ نورون های دوپامینرژیک نقش دارند [۲۸، ۲۹].

۱-۵-۱-۳ پاتولوژی

مشخصه اصلی پاتولوژیک بیماری پارکینسون مرگ سلولی در جسم سیاه خصوصاً در بخش شکمی قسمت متراکم جسم سیاه می باشد [۳۰].

¹ mitophagy

در برش از سطوح مختلف ساقه مغز، از بین رفتن نورون را می‌توان از کاهش رنگ دانه نوروملانی در جسم سیاه و لوکوس سرولئوس استنباط کرد. در هیستوپاتولوژی از جسم سیاه و مناطق مختلف دیگر مغز، از بین رفتن نورون ها و وجود اجسام لوئی را در بقایای آن ها نشان می‌دهد. از بین رفتن نورون ها با مرگ آستروسیت ها (سلول های گلیال به شکل ستاره) و فعال سازی میکروگلیا (نوع دیگری از سلول گلیال) همراه است. یکی از ویژگی های کلیدی پاتولوژیکی بیماری پارکینسون وجود اجسام لوئی حاوی پروتئین سینوکلئین می باشد [۳۱].

۱-۵-۱-۴. تظاهرات بالینی

بیماری پارکینسون بر روی حرکت تاثیر می‌گذارد و باعث ایجاد علائم حرکتی می‌شود. علائم غیر حرکتی بیماری پارکینسون شامل اختلال اتونوم، مشکلات عصبی روانی (خلق و خوی، شناخت، رفتار و یا تغییرات اندیشه) و مشکلات حسی و خواب می‌باشد [۳۲].

۱-۵-۱-۴-۱. علائم حرکتی: چهار علائم حرکتی اصلی بیماری پارکینسون : لرزش، سفتی، کندی حرکت و بی ثباتی در حرکت می‌باشد.

۱-۵-۱-۴-۱-۱. رایج ترین علامت آشکار و شناخته شده لرزش است. هر چند حدود ۳۰٪ از افراد مبتلا به بیماری پارکینسون، لرزش در شروع بیماری را ندارند، توسعه آن با پیشرفت بیماری می‌باشد. معمولاً بیشتر لرزش زمانی است که اندام در حال استراحت است و با حرکات ارادی و خواب ناپدید می‌شود. بیشتر قسمت دیستال اندام تحت تاثیر قرار می‌گیرد و شروع آن به طور معمول در یک دست یا پا و سپس دو طرفه می‌شود [۳۲].

۱-۵-۱-۴-۱-۲. یکی دیگر از ویژگی‌های مشخصه بیماری پارکینسون کندی در حرکت است. تظاهرات اولیه آن در هنگام انجام کارهای روزانه که نیاز به کنترل حرکتهای ظریف از قبیل نوشتن، دوخت و یا لباس پوشیدن می‌باشد [۳۲].

۱-۵-۱-۴-۱-۳. سفتی، سختی و مقاومت اندام در برابر حرکت ناشی از افزایش تون عضلانی، انقباض بیش از حد و مداوم عضلات است. سفتی ممکن است با درد مفاصل همراه باشد. درد تظاهر اولیه این بیماری است [۳۲].

در مراحل اولیه بیماری پارکینسون، سفتی اغلب نامتقارن و عضلات گردن و شانه را قبل از عضلات صورت و اندام‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهد. با پیشرفت بیماری، سفتی معمولا تمام بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش توانایی حرکت می‌شود [۳۳].

۱-۵-۱-۴-۱-۴. بی‌ثباتی در حرکت معمولا در مرحله آخر این بیماری است که منجر به اختلال در تعادل و سقوط مکرر و شکستگی استخوان می‌شود. بی‌ثباتی اغلب در افراد جوان در مراحل اولیه وجود ندارد [۳۴].

دیگر نشانه‌های حرکتی شامل اختلالات در وضعیت، راه رفتن (کشیدن سریع قدم‌ها و حالت رو به جلو خم هنگام راه رفتن)، اختلال در گفتار و بلع از جمله اختلال در صدا، صورت ماسک مانند و دست خط کوچک می‌باشد [۳۲].

۱-۵-۱-۴-۲. علائم عصبی روانی

اختلالات عصبی می‌تواند از خفیف تا شدید متغیر باشد که شامل اختلالات گفتار، شناخت، خلق و خو، رفتار و تفکر است. اختلالات شناختی می‌تواند در مراحل اولیه این بیماری و گاهی اوقات قبل از تشخیص رخ دهد. رایج ترین اختلال شناختی در افراد مبتلا اختلال در عملکرد اجرایی است که می‌تواند

شامل مشکلات با برنامه ریزی، انعطاف پذیری شناختی، تفکر انتزاعی، شروع اقدامات مناسب و مهار اقدامات نامناسب و انتخاب اطلاعات حسی می‌باشد. حافظه به خصوص در یادآوری اطلاعات یادگرفته شده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. فرد مبتلا به بیماری پارکینسون دو تا شش برابر خطر ابتلا به زوال عقل در مقایسه با جمعیت دارد. شیوع زوال عقل با طول مدت بیماری را افزایش می‌دهد. زوال عقل با کاهش کیفیت زندگی در بیماران و مراقبان آنها، افزایش مرگ و میر و احتمال بالای نیاز به پرستاری در منزل مرتبط می‌باشد [۳۵].

۱-۵-۵. تشخیص بیماری پارکینسون

تشخیص بیماری پارکینسون عمدتاً بالینی است و پزشک آن را از روی تاریخچه پزشکی و معاینه بیماری می‌تواند تشخیص دهد که به وجود گروهی از علائم و نشانه‌های خاص از جمله وجود برادیکینزی، رژی‌دیتی، ترمور استراحتی و بی ثباتی وضعی بستگی دارد. اقدامات پاراکلینیکی نظیر اقدامات تصویر برداری ازمغز و آنالیزهای سرم عمدتاً تغییرات اختصاصی در بیماری پارکینسون ندارد و تنها جهت اطمینان از سایر بیماری‌ها انجام می‌گیرد.

راه تشخیص دیگر این است که به بیماران لوودوپا داده می‌شود و در صورت بهبود علائم حرکتی بیماری پارکینسون تشخیص داده می‌شود. تشخیص قطعی و مستدل بیماری نیازمند نمونه برداری مغزی و اتوپسی است. وجود لوئی بادی در مغز میانی جسد نشان می‌دهد که بیمار به بیماری پارکینسون مبتلا بوده است [۳۴].

۱-۵-۶. درمان

این بیماری درمان قطعی ندارد، اما داروهایی مثل لوودوپا، آمانتادین، بی پریدین و سلیژیلین در درمان آن تجویز می‌شود. گاه از جراحی نیز استفاده می‌شود. البته نقش کاردرمانی و فیزیوتراپی در این زمینه بسیار زیاد است، زیرا مانع پیشرفت بیماری و محدودیت حرکت می‌شود.

۱-۵-۶-۱. دارودرمانی

هیچ درمانی برای بیماری پارکینسون وجود ندارد و درمان دارویی و جراحی باعث تسکین علائم بیماری می‌شود. داروهای اصلی برای بهبود علائم حرکتی شامل لوودوپا، آگونیست‌های دوپامین و مهارکننده‌های منوآمین اکسیداز نوع B می‌باشد.

هدف درمان در مرحله اول، کنترل علائم و عوارض جانبی ناشی از بهبود عملکرد دوپامینرژیک است. آغاز درمان با لوودوپا ممکن است با استفاده از داروهای دیگر مانند مهارکننده‌های مونو آمین اکسیداز B و آگونیست‌های دوپامین، به این امید تاخیر در آغاز dyskinesias به تعویق بیافتد. در مرحله دوم هدف این است که برای کاهش علائمی است که نوسانات پاسخ به دارو، حذف ناگهانی از دارو یا استفاده بیش از حد دارو ایجاد می‌کند [۳۶]. هنگامی که داروها برای کنترل علائم کافی نباشد، جراحی و تحریک عمقی مغزی استفاده می‌شود. در مراحل نهایی بیماری، مراقبت تسکینی ارائه شده است به منظور بهبود کیفیت زندگی است [۳۷].

۱-۵-۱-۶-۱-۱: لوودوپا : لوودوپا در نورون‌های دوپامینرژیک توسط دوپا دکربوکسیلاز به دوپامین تبدیل می‌شود. از آنجا که علائم حرکتی از فقدان دوپامین در جسم سیاه ایجاد می‌شود، لوودوپا علائم حرکتی را به طور موقت کاهش می‌دهد. ۵-۱۰٪ لوودوپا از سد خونی مغزی عبور می‌کند باقی مانده آن اغلب به دوپامین متابولیزه و در جاهای دیگر باعث تهوع، dyskinesias و سفتی مفاصل می‌شود [۳۶].

۱-۵-۱-۶-۱-۲: آگونیست‌های دوپامین: آگونیست‌های دوپامین که در مغز به گیرنده‌های پس از سیناپسی دوپامینرژیک متصل و اثرات مشابه به لوودوپا دارد. آن‌ها در حال حاضر به طور عمده در درمان اولیه علائم حرکتی با هدف به تاخیر انداختن عوارض حرکتی استفاده می‌شود [۳۶].

۱-۵-۱-۶-۱-۳: سلجلین : مهار کننده‌های منوآمین اکسیداز نوع B باعث افزایش دوپامین در هسته‌های قاعده ای می‌شود. آن‌ها منوآمین اکسیداز B که موجب شکسته شدن دوپامین ترشح شده توسط نورون‌های دوپامینرژیک را مهار می‌کند. کاهش در نتایج فعالیت منوآمینواکسیداز B باعث افزایش لوودوپا در جسم مخطط می‌شود. مهار کننده‌های منوآمین اکسیداز مانند آگونیست‌های دوپامین باعث بهبود علائم حرکتی و به تاخیر انداختن نیاز به لوودوپا می‌شود، اما عوارض جانبی بیشتر و استفاده از آن کمتر موثر از لوودوپا هستند [۳۶].

۱-۵-۱-۶-۱-۴: داروهای آنتی کلینرژیک: معمولاً این داروها در درمان لرزه و رژی‌دیتة موثرتر از هیپو‌کینزی می‌باشد ولی تاثیر آن‌ها کمتر از داروهای دیگر است.

۱-۵-۱-۶-۱-۵: آمانتادین: این دارو باعث بهبود تمام علائم این بیماری پارکینسون می‌شود. معمولاً همراه داروهای آنتی کلینرژیک استفاده می‌شود [۳۶].

۱-۵-۱-۶-۲: جراحی

زمانی پزشکان به طور مرسوم از جراحی برای درمان بیماری پارکینسون استفاده می‌کردند ولی با پیدایش لوودوپا و دیگر داروهای درمانی، دیدگاه جراحی مورد بازبینی قرار گرفت. روش‌های زیر ممکن است یک انتخاب باشد زمانی که نشانه‌ها با دارو درمانی کنترل نمی‌شوند.

۱-۵-۱-۶-۲-۱: تحریک عمقی^۱: مناطق هدف برای تحریک عمقی مغز شامل تالاموس، گلوبوس پالیدوس و هسته‌های ساب تالامیک می‌باشد. در تحریک عمقی مغز یک دستگاه به نام neurostimulator که تکانه‌های الکتریکی به قسمت‌های خاصی از مغز می‌فرستد، قرار داده می‌شود. تحریک عمقی مغز برای کنترل لرزش افراد با بیماری پارکینسون که با دارو بهبود نمی‌یابد و یا برای کسانی که عدم تحمل به دارو دارند توصیه می‌شود [۳۷].

۱-۵-۱-۶-۲-۲: تالاماتومی: این روش برای سال‌ها برای کاهش لرزش در افراد با بیماری پارکینسون به کار رفته است. تالاماتومی در برگیرنده خرابی قسمت کوچکی از بافت تالاموس است. جراحی ممکن است موجب حرف زدن درگوشی و نامفهوم شود و گاهی اوقات کاهش هماهنگی وقتی که هر دو سمت مغز صورت گیرد. به این دلیل معمولاً در یک طرف مغز صورت می‌گیرد و فواید به یک طرف مغز محدود می‌گردد.

۱-۵-۱-۶-۲-۳: پالیدوتومی: در این شیوه از یک جریان الکتریکی برای تخریب قسمت کوچکی از گلوبوس پالیدوس استفاده می‌شود. پالیدوتومی می‌تواند لرزش را بهبود بخشد، سفتی و حرکات آهسته را با تداخل در شبکه عصبی بین گلوبوس پالیدوس و تالاموس بهتری کند [۳۸، ۳۹].

۱-۵-۲. عقده‌های قاعده‌ای^۲

^۱ Deep brain stimulation

^۲ Basal ganglia

عقددهای قاعده ای یک گروه به هم پیوسته از هسته‌های عمقی مغز می‌باشد. هسته‌های قاعده ای شامل هسته‌های متعدد زیر قشری که در جلو مغز واقع شده است. هسته‌های قاعده ای به شدت با قشر مخ، تالاموس، ساقه مغز و همچنین دیگر مناطق مغز متصل شده است. هسته‌های قاعده ای در کنترل حرکت ارادی بدن، یادگیری، رفتار و عادات مانند دندان قروچه، حرکات چشم، شناخت و احساسات دخیل می‌باشند [۴۰].

از نظر فیزیولوژیکی این هسته‌ها شامل کودت^۱، پوتامن^۲ و گلوبوس پالیدوس^۳ در مغز جلویی، هسته ساب تالاموس در دیانسفال و ماده سیاه^۴ در مزانسفال می‌باشد. به مجموع هسته‌های کودت و پوتامن استریاتوم^۵ گفته می‌شود [۴۱]. ورودی اطلاعات به عقددهای قاعده ای از طریق کودیت و پوتامن (استریاتوم) انجام می‌گیرد، این اطلاعات توسط آوران‌ها از چهار لوب کورتکس، هسته‌های تالاموسی و قسمتی از ماده ی سیاه (پارس کامپکتا^۶) انتقال داده می‌شوند.

خروجی اطلاعات از عقددهای قاعده ای معمولاً از طریق گلوبوس پالیدوس و قسمت دیگری از ماده ی سیاه (پارس رتیکولا) است که به هسته‌های تالاموسی، تشکیلات مشبک ساقه ی مغز، کالیکولوس فوقانی و نواحی حرکتی کورتیکال در لوب فرونتال ختم می‌شوند. بین این هسته‌های ورودی و خروجی ارتباطات مستقیم و غیرمستقیم وجود دارد که این عملکرد و تعامل بین این دو مسیر در حفظ تعادل و عملکرد نرمال مغز نقش به سزایی دارد.

¹ Cudate

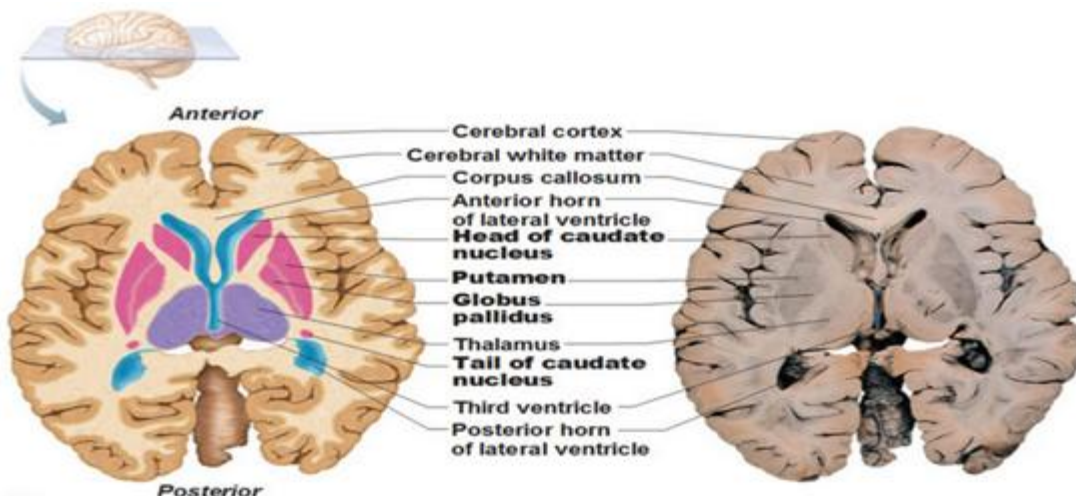
² Putamen

³ Gulobos palidous

⁴ Substantial nigra

⁵ striatum

⁶ Pars complecta



شکل ۱-۱ اجزای عقده های قاعده ای در مغز را نشان می دهد.

۱-۵-۲-۱. استریاتوم

استریاتوم وسیعترین جزء عقده های قاعده ای محسوب می گردد. در بررسی مغز انسان، استریاتوم شامل دو هسته توسط کپسول داخلی از هم جدا شده اند. این دو هسته بنام هسته دمدار و هسته پوتامن نام گرفته اند.

نئواستریاتوم^۱ در موش صحرایی یک توده خاکستری رنگ و بزرگ بوده و در بافت تازه در رنگ آمیزی نیسل تقریباً یکنواخت می باشد و از دو بخش اصلی یعنی استریاتوم پستی^۲ و استریاتوم شکمی^۳ تشکیل شده است. این دو بخش از نظر ساختمانی، مشخصات نوروشیمیایی و ارتباطات آوران به هم شبیه هستند ولی از نظر توپوگرافی و ابران ها و نوع اطلاعاتی که پردازش می کنند باهم تفاوت دارند [۴۲]. استریاتوم دریافت کننده های اصلی آوران ها به عقده های قاعده ای می باشد. این ورودی ها شامل فیبرهای

^۱ Neo striatum

^۲ dorsal striatum

^۳ ventral striatum

گلو تاماتینرژیک می باشند که از تمام نواحی مغز منشا می گیرند. فیبرهای دوپامینرژیک از بخش متراکم جسم سیاه و فیبرهایی از تالاموس می باشد. این فیبرها هسته های هدفشان را در تالاموس و ساقه مغز مهار می کند. خروجی ها از عقده های قاعده ای از بخش مشبک جسم سیاه و بخش داخلی گلوبوس پالیدوس منشاء می گیرند.

استریاتوم از طریق مسیرهای مستقیم و غیر مستقیم تالاموس راتحت تاثیر قرار می دهند که هر دو مسیر از پوتامن شروع می شود. مسیر مستقیم به بخش داخلی گلوبوس پالیدوس و بخش مشبک جسم سیاه منتهی می شود. تحریک این مسیر، مهار را از روی هسته های تالاموسی که توسط بخش داخلی گلوبوس پالیدوس و ماده سیاه ایجاد شده برمی دارد.

در مسیر غیرمستقیم بخش خارجی گلوبوس پالیدوس درگیر می شود. بامهار بخش خارجی گلوبوس پالیدوس توسط استریاتوم، هسته ساب تالاموس فعال شده و فعالیت بخش داخلی گلوبوس پالیدوس را افزایش می دهد که باعث مهار بیشتر هسته های ساب ساب تالاموسی می شود. بررسی این دو مسیر نشان می دهد که مسیر مستقیم با افزایش فعالیت تالاموس باعث تسهیل حرکت می شود. در مسیر غیر مستقیم حرکت مهار می شود.

نورون هایی که در مسیر مستقیم هستند دارای گیرنده D1 برای دوپامین هستند که تحریکی هستند. گیرنده هایی که در مسیر غیر مستقیم هستند دارای گیرنده D2 هستند که مهاری می باشند. براین اساس، فیبرهای دوپامینرژیک از بخش متراکم ماده سیاه که در استریاتوم ختم می شوند. انتقال در مسیر مستقیم را تسهیل می کنند و انتقال در مسیر غیر مستقیم را مهار می کنند.

بیماری هایی که بازال گانگلیا را درگیر می کنند موجب تحریک یا مهار بیش از حد یکی از مسیرها می شود. چنانچه تعادل بیشتر به نفع مسیر مستقیم باشد، اختلالات هیپرکینتیک رخ می دهد و اگر تعادل

به نفع مسیر غیر مستقیم باشد، اختلالات هیپوکینتیک ایجاد می شود که بیماری پارکینسون جزء اختلالات هیپوکینتیک می باشد [۴۳، ۴۴].

۱-۵-۲-۲. جسم سیاه

جسم سیاه در بخش شکمی تگمنتوم مغز میانی قرار دارد که نقش مهمی در پاداش، اعتیاد و حرکت ایفا می کند. واژه جسم سیاه منعکس کننده این واقعیت است که بخش هایی از جسم سیاه تیره تر از مناطق اطراف به خاطر سطح بالای نوروملانی^۱ در نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه می باشد. جسم سیاه یکی از چهار جزء عقده های قاعده ای به شمار می رود. طول جسم سیاه در جهت سری-دمی ۲/۵ میلی متر و پهنای آن در جهت میانی-جانبی ۳ میلی متر می باشد. حجم بخش متراکم جسم سیاه mm^3 ۰/۳ و محتوی ۱۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ نورون در هر طرف می باشد. جسم سیاه در مهره داران پست به صورت بدوی و رشد نیافته است ولی به طور مشخص در پستانداران یافت می شود و در مغز انسان به بزرگترین مقدار خود می رسد [۴۵].

رنگ سیاه این قسمت به دلیل رنگدانه ملانین که از متابولیسم دوپامین تولید می شود و در نورون های بخش متراکم می باشد و به خوبی با چشم غیر مسلح دیده می شود. این هسته ناحیه ای از مغز است که تحقیقات زیادی در رابطه با آن به انجام رسیده و در بیماری عصبی پارکینسون نورون های دوپامینرژیک آن تحلیل می روند [۴۶].

جسم سیاه متشکل از عناصری می باشد که از نظر نوروشیمیایی و عملکردی با هم مرتبط می باشند. جسم سیاه شامل یک بخش متراکم در مجاورت تگمنتوم با سلول های حاوی رنگدانه نوروملانی^۱ و یک بخش مشبک در مجاورت پایک های مغزی می باشد. بخش جانبی جسم سیاه در امتداد جانبی بخش متراکم آن می باشد. بخش متراکم جسم سیاه از نورون های دوپامینرژیک با اندازه متوسط و تراکم زیاد

¹ neuromelanin

تشکیل شده است. اندازه جسم سلولی هر نورون ۲۰-۱۱ میکرومتر بوده و دارای یک هسته خارج از مرکز می‌باشد. بخش مشبک متشکل از نورون‌های چند قطبی و گابائریژیک می‌باشد که به شکل بیضوی، گرد یا مثلثی هستند و شبیه نورون‌های گلوبوس پالیدوس می‌باشند. بخش جانبی کوچکترین قسمت جسم سیاه می‌باشد که نورون‌هایی با اندازه متوسط و به شکل گرد، دوکی و ستاره ای دارند. برخی از نورون‌های بخش جانبی جسم سیاه دوپامینرژیک می‌باشد که به آمیگدال و استریاتوم فیبر ارسال می‌کند و برخی دیگر غیر دوپامینرژیک می‌باشند و به کالیکولوس تحتانی فیبر می‌فرستند [۴۷].

۱-۵-۲-۳. گلوبوس پالیدوس

گلوبوس پالیدوس از دیانسفال مشتق شده و بین پوتامن و کپسول داخلی قرار دارد و از دو هسته مجزا خارجی و داخلی تشکیل شده که به وسیله لایه نازکی از آکسون‌ها از یکدیگر جدا شده اند. هر دو هسته حاوی تعداد کمی نورون‌های بزرگ با دندریت‌های طولانی می‌باشد. دوپامین آزاد شده از مسیر نیگرو استریاتال اثرات عملی مخالفی بر روی دو نوع جمعیت سلولی استریاتوپالیدال دارد به گونه ای که نورون‌های پروجکت شده به بخش خارجی و داخلی گلوبوس پالیدوس را به ترتیب مهار و تحریک می‌کنند. هر دو قسمت گلوبوس پالیدوس ارتباطات آوران و وبران مجزایی دارند.

بخش داخلی گلوبوس پالیدوس (همراه با قسمت مشبک جسم سیاه) به دلیل اینکه منشا اکثر فیبرهایی بوده که به قسمت‌های دیگر محور مغزی-نخاعی می‌روند به عنوان خروجی اصلی عقده‌های قاعده ای شناخته شده است.

منشاء اصلی آوران قسمت داخلی گلوبوس پالیدوس استریاتوم می‌باشد و به دلیل اینکه به طور مستقیم فعالیت سلول‌های خروجی پالیدال داخلی را کنترل می‌کند، مسیر مستقیم نام گرفته است. وبران قسمت داخلی گلوبوس پالیدوس گابارژیک می‌باشد. قسمت خارجی گلوبوس پالیدوس نیز

پروجکشن گاباژیک از استریاتوم دریافت داشته و به علت اینکه به طور غیر مستقیم بر روی فعالیت‌های سلول‌های گلوبوس داخلی از طریق یک ارتباط با هسته تالاموس اثر می‌گذارد، منشاء مسیر غیر مستقیم می‌باشد. الیاف آوران آن شامل الیاف striatopalidal می‌باشند. این الیاف از هسته‌های دمدار و پوتامن به سمت گلوبوس پالیدوس می‌روند. این الیاف ماده GABA را به عنوان نوروترانسمیتر آزاد می‌کند.

وابران‌ها شامل ۴ گروهند: الیافی که به هسته‌های تالاموس می‌رود، الیافی که به ساب تالاموس می‌رسد، الیافی در بخش تحتانی تگمنتوم ساقه مغز خاتمه می‌یابند و الیاف Pallidosubthalamic که به هسته‌های ساب تالامیک می‌روند [۴۸].

۱-۵-۲-۴. نوروترانسمیترها

نوروترانسمیترها موادی هستند که در ترمینال‌های پیش سیناپسی سنتز و نگهداری می‌شوند و در برابر تحریک مناسب آزاد شده و از شکاف سیناپسی عبور کرده و با نقاط گیرنده اختصاصی در سلول بعد از سیناپس باند می‌شوند. نوروترانسمیترها مواد شیمیایی هستند که قادر به انتقال پیام عصبی می‌باشند. آن‌ها سیگنال را در سراسر یک سیناپس شیمیایی، از جمله در محل اتصال عصبی، عضلانی از یک نورون (سلول عصبی) به یک نورون یا سلول هدف دیگر، سلول‌های عضلانی و یا سلول غده انتقال می‌دهد [۴۹].

مهمترین نوروترانسمیترها از نظر عمل عقده‌های قاعده‌ای عبارتند از گلوتامات که سبب فعال شدن پروژکسیون‌های حرکتی کورتیکال استریاتال می‌شود، استیل کولین، دوپامین، گاما آمینوبوتیریک اسید^۱ و سروتونین. عقده‌های قاعده‌ای دارای مواد فعال بیولوژیک دیگر مثل ماده P، انکفالین، کوله سیستوکینین و سوماتواستاتین نیز می‌باشد که ممکن است اثرات نوروترانسمیترها را تشدید یا تخفیف دهند. نور اپی نفرین نیز به مقدار کم موجود ولی عمل آن به درستی مشخص نیست.

¹ (GABA): Gamma-Aminobutyric acid

استیل کولین یک نوروترانسمیتر می‌باشد که در گانگلیون‌های اتونومیک و عقده‌های قاعده‌ای نیز یافت می‌شود. بیشترین غلظت Ach و کولین استراز و استیل کولین استراز (که به ترتیب این دو آنزیم در سنتز و تخریب Ach شرکت می‌کنند) در استریاتوم یافت می‌شود. استیل کولین توسط نورون‌های نئواستریاتال کوچک (گلژی تیپ ۲) سنتز و آزاد می‌شود که روی آن‌ها اثر تحریکی دارد.

از کاتکولامین‌ها دوپامین، نوراپی نفرین و اپی نفرین قابل ذکرند که دوپامین از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند. در مغز دوپامین توسط آنزیم‌های مونوآمین اکسیداز و کاتکول _ا_ متیل ترانسفراز^۱ متابولیزه می‌شود. مواد نهایی عبارت اند از همووانیلیک اسید و دی هیدروکسی فنیل استیک اسید^۲ می‌باشد [۵۰].

نواحی غنی از دوپامین عبارتند از جسم سیاه که دوپامین توسط سلول‌های عصبی بخش متراکم سنتز می‌شود و استریاتوم می‌باشد. تحریک جسم سیاه باعث می‌شود و دوپامین از استریاتوم آزاد شود و اثر وقفه ای بر روی نورون‌های نئو استریاتال دارد.

الیاف استریاتو نیگراال در بخش مشبک جسم سیاه دارای گلوتامیک اسید دکربوکسیداز^۳ می‌باشد که این آنزیم در سنتز گاما آمینوبوتیریک اسید مصرف می‌شود. گابا در جسم سیاه، استریاتوم و گلوبوس پالیدوس یافت می‌شود و اثر وقفه ای دارد [۵۰].

۵-۳-۱ مدل تجربی بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون یکی از بیماری‌های انسانی محسوب می‌شود که فرم خود به خودی آن در حیوانات ظاهر نمی‌گردد. با این وجود برخی از علائم مشخصه بیماری را می‌توان با تجویز عوامل

^۱ (COMT):Catechol-O-Methyltransferase

^۲ (Dopac) 3,4-Dihydroxyphenylacetic

^۳ (GAD): Golotamic acid decarboxidase

فارماکولوژی (مهار کننده آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز) نظیر رزپین^۱، عوامل نوروتوکسین نظیر مت آمفتامین^۲، ۶- هیدروکسی دوپامین^۳ و ۱-متیل ۴-فنیل -۶،۳،۲،۱-تتراهیدرو پیریدین به وجود آورد [۵۱،۵۲].

۱-۵-۴. مدل های حیوانی بیماری پارکینسون

۱-۵-۴-۱. مدل رزپین:

رزپین جزء مدل های اولیه PD دارویی شناخته شده است. Carlsson و همکاران نشان داده اند که وقتی به موش های مبتلا برای تخلیه دوپامین و دیگر کاتاکولامین ها در مغز، رزپین داده می شود، درجاتی از آکینزیا نشان می دهند که توسط L-DOPA درمان می شود. اعتقاد بر این است که رزپین به واسطه اثرات خود به طور موقت در ذخیره سازی کاتکول آمین ها در وزیکول سیناپسی از طریق منیزیم و مکانیسم های وابسته به ATP تداخل دارد. در دوزهای بالا ذخایر دوپامین و سایر نوروترانسمیترها مثل آدرنالین، نورآدرنالین، هیستامین و سروتونین کاهش می یابد و کاهش دوپامین در استریاتوم مسئول علائم حرکتی بیماری پارکینسون می باشد.

۱-۵-۴-۲. متآمفتامین

متآمفتامین برای هر دو پایانه سروتونرژیک و دوپامینرژیک سمی است. در درجه اول متآمفتامین پایانه های دوپامینرژیک را در جسم مخطط، هسته اکومبیس و لوب فرونتال از بین می برد اما اجسام سلولی آن ها در جسم سیاه و ناحیه تگمنتوم قدامی بدون آسیب باقی می ماند مگر اینکه با مقدار زیادی استفاده شود. متآمفتامین می تواند از طریق انتقال فعال به وسیله ناقل دوپامین و انتشار ساده از طریق

¹ Reserpin

² methamphetamine

³ 6-OHDA (6-Hydroxydopamine)

غشای پلاسمایی به نورون‌های دوپامینرژیک وارد شود. در داخل نورون‌های دوپامینرژیک، متامفتامین باعث آزاد شدن دوپامین به داخل سیتوزول و توسط ناقل دوپامین به شکاف سیناپسی می‌شود که در نتیجه باعث استرس اکسیداتیو می‌شود. متامفتامین ها، داروهای محرک روانی اعتیاد آوری هستند که با ورود به سیستم عصبی مرکزی باعث آزاد شدن ناگهانی دوپامین در مغز می‌شود و باعث تحریک سلول های مغزی و افزایش حالت تهاجمی و افزایش حرکات جسمی می‌شود. مصرف مزمن متامفتامین باعث سمیت عصبی به صورت کاهش فعالیت انتقال دهنده دوپامین استریاتال شده و این می‌تواند به لحاظ بالینی با نقایص شناختی و کندی سایکوموتور همراه باشد و علائم اختلال حرکتی پارکینسون در فرد ایجاد کند.

۱-۵-۴-۳. پاراکوات^۱

پاراکوات ساختاری شبیه به MPP⁺ دارد ولی خصوصیات حمل و نقل و مکانیسم‌های سمیت متفاوتی دارد. با وجود کاتیون بودن هر دو، پاراکوات می‌تواند به وسیله انتقال دهنده‌ی آمینواسیدی خنثی از سد خونی مغزی عبور کند و وارد مغز شود. برخلاف MPP⁺ که یک ماده عالی برای انتقال دوپامین است، پاراکوات اینچنین نیست. سمیتی که توسط پاراکوات ایجاد می‌شود با واسطه چرخه ردوکس با تعریق سلولی از جمله NADPH اکسیداز ونیتریک اکسیداز انجام می‌شود و منتهی به تولید سوپراکسیداز می‌شود. پاراکوات در میتوکندری به عنوان بازدارنده فعالیت کمپلکس I نمی‌باشد. با تزریق پاراکوات به موش، اختلال حرکتی و از دست دادن نورون‌های دوپامینرژیک به جزء در جسم مخطط، تجمع α -synuclein و لوئی بادی گزارش شده است.

۱-۵-۴-۲. روتنون^۲

^۱ paraquat

^۲ Rotenone

روتنون یک آفت کش است که به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. روتنون به دلیل چربی دوست بودن از سد خونی و مغزی عبور می‌کند و به راحتی بدون اینکه وابسته به ناقل باشد وارد سلول‌ها می‌شود. روتنون فعالیت کمپلکس I میتوکندری را متوقف می‌کند. با تزریق روتنون تخریب انتخابی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه و ایجاد انکلوژیون‌های سیتوپلاسمی و α -synuclein گزارش شده است. یکی از نگرانی‌های اصلی در مدل روتنون این است که حساسیت حیوانات به این سم متنوع می‌باشد [۵۳].

MPTP.۵-۴-۵-۱

این ماده نورون‌های دوپامینی را تخریب می‌کند و باعث ایجاد بیماری پارکینسون می‌شود. در این بیماران کندی، سفتی و لرزش پیشرفت می‌کند و با درمان جایگزینی دوپامین بهبود می‌یابد. MPTP از سد خونی و مغزی عبور می‌کند و به MPP^+ اکسید می‌شود. MPP^+ در میتوکندری تجمع می‌یابد و در عملکرد زنجیره تنفسی تداخل ایجاد می‌کند. شباهت شیمیایی بین MPTP و برخی از علف‌کش‌ها و آفت‌کش‌ها پیشنهاد می‌شود که سموم مانند MPTP ممکن است یک علت بیماری پارکینسون باشد [۲۳].

۵-۴-۶-۱. مدل ۶-هیدروکسی دوپامین

بیماری پارکینسون یکی از اختلالات نورودژنراتیو رایج در انسان می‌باشد که چندین نوروتوکسین باعث ایجاد مدل حیوانی و ایجاد اختلالات حرکتی و در نتیجه باعث ایجاد بیماری پارکینسون می‌شود. مدل تزریق یک طرفه 6-OHDA در موش صحرایی به طور معمول استفاده می‌شود و مزیت آن ایجاد اختلالات حرکتی می‌باشد.

¹ 1-methyl-4-phenylpyridinium

خصوصیت نورو توکسیک ۶- هیدروکسی دوپامین در القاء تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشد که باعث ایجاد بیماری پارکینسون در جوندگان می‌شود. برخلاف MPTP، ۶- هیدروکسی دوپامین قادر به عبور از سد خونی مغزی نمی‌باشد و تزریق مستقیم به داخل مغز انجام می‌شود. این ماده باعث کاهش دوپامین، آدرنالین و نورآدرنالین در نواحی آسیب دیده مغزی می‌شود. در حالی که مقدار سایر نوروترانسمیترها (گابا، استیل کولین، سروتونین) بدون تغییر باقی می‌ماند. نورو توکسین ۶-هیدروکسی دوپامین به علت شباهت زیادی که با سایر کاته‌کول آمین‌ها دارد به طور انتخابی توسط سیستم انتقال کاتکولامین وارد سلول می‌شود [۵۴].

به دنبال تزریق 6-OHDA به داخل استریاتوم کاهش دراز مدت، پایدار و بارز تعداد نورون‌ها در جسم سیاه همان طرف رخ می‌دهد (اثر رتروگرا). 6-OHDA توسط نورون‌های جسم سیاه همانند دوپامین شناخته شده و در داخل سلول‌ها به صورت گرانولار ذخیره شده و سپس به سلول باند شده و با تحریک عصبی آزاد شده به عنوان یک نوروترانسمیتر کاذب عمل می‌کند. میزان بالای تجمع سیتوپلاسمی آن باعث تولید میزان بالایی از محصولات 6-OHDA مثل پراکسیدها، سوپر اکسیدها و کوپنون‌ها شده که این فرآورده‌ها باعث تخریب نورونی می‌شود. شبکه آندوپلاسمی خشن^۱، غشای سلولی، هسته و میتوکندری اولین محل‌هایی هستند که توسط 6-OHDA آسیب می‌بینند. این سم در میتوکندری موجب مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شود. این سم در CNS حیوانات تغییراتی در نورون‌های دوپامینرژیک و مونوآمینرژیک ایجاد می‌کند. ذخایر دوپامین به صورت اولیه پس از تزریق افزایش می‌یابد ولی سپس میزان آن پس از آسیب‌های متوالی به نورون‌های دوپامینی کاهش یافته و تمام می‌شود. نورو توکسین 6-OHDA از طریق القاء تولید آب اکسیژنه و رادیکال‌های آزاد و بسیار فعال

^۱ Rough Endoplasmic Reticulum

هیدروکسیل مشتق از آن و احتمالا در حضور آهن موجب آسیب مسیر دوپامینرژیک نیگرو استریاتال می‌گردد [۵۵].

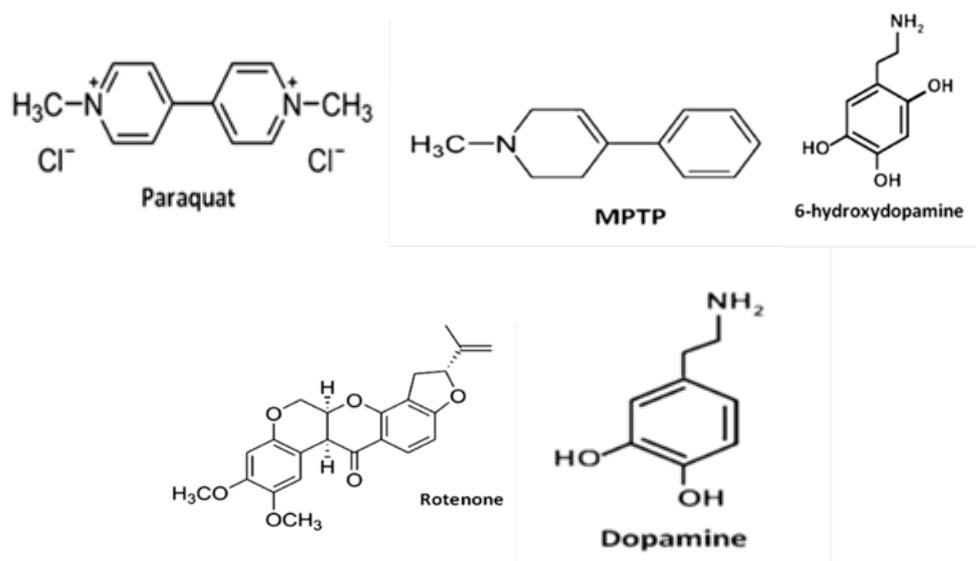
۱-۵-۶. تغییرات رفتاری بعد از تزریق یکطرفه 6-OHDA

نئواستریاتوم نقش مهمی در تنظیم اعمال حرکتی بدن به عهده دارد و یکی از آوران‌های اصلی آن سیستم دوپامینرژیک نیگرو استریاتال می‌باشد. ۱۵-۱۰ درصد پایانه‌های موجود در نئواستریاتوم را تشکیل داده و آسیب آن اثر بارزی در اعمال حرکتی بدن بجا می‌گذارد. با تزریق یک طرفه 6-OHDA به داخل استریاتوم موش صحرایی بخش اعظم نورون‌های دوپامینرژیک از بین رفته و در نتیجه کاهش سطح دوپامین در استریاتوم همان طرف ضایعه ایجاد می‌گردد. این تغییرات یک طرفه باعث ایجاد عدم تقارن حرکتی می‌شود که با استفاده از آگونیست‌های مستقیم دوپامینرژیک نظیر آپومورفین که مستقیما بر روی گیرنده اثر می‌کند به طور کمی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. آپومورفین باعث القاء چرخش به سمت راست در حیوانات با تخریب طرف چپ استریاتوم می‌گردد [۵۶].

۱-۵-۷. تغییرات ساختمانی و بیوشیمیایی پس از تخریب یکطرفه با ۶ هیدروکسی

دوپامین

Ichitani و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که سطح دوپامین و متابولیت‌های آن به طور اختصاصی چهار هفته پس از تزریق داخل استریاتال نوروکسین ۶- هیدروکسی دوپامین در نواحی جسم سیاه و استریاتوم همان طرف با تخریب شدیداً کاهش می‌یابد. بعلاوه افزایش حساسیت گیرنده‌های دوپامینرژیک رخ می‌دهد و فعالیت خودبه‌خودی نورون‌های استریاتوم افزایش می‌یابد.



شکل ۱ ساختار شیمیایی

۱-۶. اتوفازی^۱

اتوفازی (به زبان یونانی خود خواری) فرآیندی برای کنترل میزان و کیفیت محتویات سیتوپلاسمی در سیتوپلاسم سلول های یوکاریوتیک است که شامل تخریب و هضم پروتئین های آسیب دیده یا بد شکل گرفته و ارگانل های طویل العمری چون میتوکندری و پراکسی زوم می باشد. در شرایط عادی اتوفازی به منظور حفظ هموستاز سلول، در مقادیر پایینی انجام می شود. در حالی که در شرایط استرس زا مانند محرومیت غذایی، کمبود فاکتورهای رشد و شرایط پاتولوژیک مانند عفونت ها و تجمع ماکرومولکول های توکسیک به سرعت القاء می شود. اتوفازی نقش مهمی را در تکامل و تمایز سلولی به عهده دارد و اختلال در اتوفازی باعث پیری و بیماری های نورو دژنراتیو مانند آلزایمر، پارکینسون و بیماری هانتینگتون می شود.

^۱ Autophagy

۱-۶-۱. اتوفاژی مکانیسمی در هموستاز سلولی

براساس اینکه محتویات سیتوپلاسمی از چه طریقی وارد لومن لیزوزوم شود، سه فرم مختلف اتوفاژی

تعریف می‌شود.

۱- ماکرو اتوفاژی یا اتوفاژی ساده

۲- میکرو اتوفاژی

۳- اتوفاژی با واسطه چاپرون^۱ (CMA)

ماکرو اتوفاژی شکل غالب اتوفاژی است. در طی ماکرو اتوفاژی ابتدا غشاهای جداکننده تشکیل می‌شوند، سپس پروتئین‌ها یا ارگانل‌های هدف توسط این غشاها احاطه شده و ساختاری به نام اتوفاگوزوم ایجاد می‌شود. نهایتاً اتوفاگوزوم با لیزوزوم ادغام شده (اتوفاگولیزوزوم) و تخریب اجزای بلعیده شده صورت می‌گیرد. از آن جایی که لیزوزوم حاوی انواع آنزیم‌های هیدرولیز کننده از جمله پروتئاز، لیپاز و گلکوزیداز است. اتوفاژی همزمان قادر به تجزیه انواعی از اجزای سیتوپلاسمیک است.

میکرو اتوفاژی به فرآیندی القاء می‌شود که در آن پروتئین‌ها به صورت لوکال و مستقیم توسط

لیزوزوم برداشته می‌شود. ماکرو و میکرو اتوفاژی می‌توانند ساختارهای بزرگ را از طریق مکانیسم‌های انتخابی و غیر انتخابی تخریب کنند.

در اتوفاژی به واسطه چاپرون‌ها، از طریق فرآیند انتخابی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰^۲، پروتئین

محلول و همچنین پروتئین‌هایی که دارای سیگنال پتید هستند به لیزوزوم هدایت می‌کند.

^۱ (CMA) Chaperone-mediated autophagy

^۲ (HSP-70): Heat shock protein

اتوفاژی شامل جداسازی سیتوپلاسم در وزیکول سیتوزولی با غشای دو لایه به نام اتوفاگوزوم^۱، جوش خوردن با لیزوزوم برای تشکیل اتولیزوزوم و تخریب با هیدرولازهای لیزوزومی می‌باشد.

در حال حاضر ۳۲ ژن دخیل در اتوفاژی در پستانداران شناسایی شده است که به عنوان ژن‌های وابسته در اتوفاژی شناخته شده اند (Atg).

در این میان ۱۶ ژن شامل (Atg1-10, Atg12-14, 16 and 18) در انواع اتوفاژی مورد نیاز هستند.

این پروتئین‌های Atg به ۶ گروه تقسیم می‌شوند.

۱-کمپلکس ULK1 کیناز (ULK1, mAtg13, FIP200, Atg101) برای القاء اتوفاژی

۲- Atg9 برای تشکیل غشا

۳-کمپلکس فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز شامل (Vps34-Beclin1-Vps15-mAtg14) برای تشکیل هسته وزیکول

۴-فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ فسفات (PI3P) باکمپلکس Atg2-Atg18

۵-سیستم کونزوگه Atg12-Atg5- Atg16L1

۶-سیستم کونزوگه Atg8 که شامل فسفاتیدیل اتانول آمین است (Atg8-PE) که در گسترش غشاها شرکت می‌کند.

۱-۶-۱. القاء اتوفاژی از طریق کمپلکس mTOR و ULK1

تحت شرایط استرس مثل فقر اسیدهای آمینه اتوفاژی القاء می‌شود. تاثیرات آمینواسیدها در توانایی آنها در تنظیم اتوفاژی متفاوت است. mTOR در کنترل چندین فرآیند داخل سلولی در پاسخ به

¹ Autophagosome

تغییرات غذایی شرکت می‌کند. کمپلکس mTORC به Rheb، Rag GTPase و VPs34 برای فعال سازی خود کمپلکس و مهار اتوفاژی نیازمند است. در ابتدا سطوح انرژی توسط (AMPK) که فاکتور کلیدی برای هومئوستازی انرژی سلولی سنجیده می‌شود. در سطوح انرژی پایین AMPK فعال شده و mTOR را غیر فعال می‌کند که نتیجه آن القاء اتوفاژی می‌باشد.

کمپلکس ULK1 که شامل (Atg101، FIP200، mAtg13، ULK1) در پستانداران شکل می‌گیرد که در تشکیل اتوفاگوزوم بدون توجه به موقعیت‌های تغذیه ای دخالت دارد. فعال سازی کمپلکس ULK1 به وسیله mTOR تحت شرایط تغذیه ای تنظیم می‌شود. در هنگامی که مواد غذایی در سلول بالا است، پروتئین mTOR به پروتئین‌های ULK1، Atg13 و FIP200 متصل شده و پروتئین‌های ULK1 و Atg13 را هاپیرفسفریله می‌کند. در اثر فسفریلاسیون اضافی مولکول‌ها ULK1 و Atg13، گسترش غشاءهای اتوفاژی درون سیتوپلاسم مهار می‌شود.

گرسنگی سلول و یا داروهایی نظیر راپامایسین تجمع پروتئین mTOR را با ULK1 مهار می‌کند. بدین وسیله پروتئین‌های مزبور از طریق عملکرد نامناسب mTOR، سطح پایین تری از فسفریلاسیون را خواهند داشت که به این وضعیت هاپو فسفریلاسیون می‌گوییم. هاپو فسفریلاسیون این پروتئین‌ها سبب القای اتوفاژی می‌شود.

۱-۶-۲. کمپلکس Class III PI3K در هسته اتوفاگوزوم

در پستانداران، کمپلکس Class III PI3K نقش اساسی در جداسازی غشای هسته دارد. Class III PI3K (VPs34) در ارتباط با Beclin 1 و P150 می‌باشد که برای شکل گیری هسته کمپلکس Class III PI3K مورد نیاز است. در مرحله اول شکل گیری اتوفاگوزوم، هسته اتوفاگوزوم به Beclin 1 نیاز دارد. Beclin 1 در تعامل با Beclin 2 می‌باشد که با هسته کمپلکس Class III PI3K برای تشکیل PI3P مرتبط می‌شود.

Beclin 1 نقش مهمی در شروع اتوفاژی و در ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو و سرطان‌ها دارد.

چند محتوای کمپلکس Beclin 1 شناسایی شده است.

۱- Atg14L که برای شکل‌گیری اتوفاگوزوم ضروری می‌باشد.

۲- UVRAG

۳- AMBRA1 تنظیم‌کننده مثبت اتوفاژی وابسته به Beclin1 است.

۴- BIF1 با Beclin 1 در تعامل می‌باشد و تومورنزیس را متوقف می‌کند.

۵- RUBICON با تعامل با Beclin 1 به صورت خود تنظیمی منفی در بلوغ اتوفاگوزوم شرکت می‌کند.

۶- BCL2 با Beclin 1 باند می‌شود که اتوفاژی را از طریق اختلال در تعامل بین Beclin 1 و کمپلکس

Class III PI3K مهار می‌کند.

۱-۶-۳. سیستم‌های کونزوگه در گسترش غشاهای اتوفاگوزوم

دو سیستم کونزوگه یوبیکوئیتین در گسترش غشاهای اتوفاگوزوم شرکت می‌کنند. اولین سیستم

کونزوگه یوبیکوئیتین Atg5-Atg12-Atg16L1 می‌باشد که برای شکل‌گیری اتوفاگوزوم اولیه ضروری

می‌باشد. Atg12 یک پروتئین با ۱۸۶ آمینواسید است که با Atg5 کونزوگه می‌شود. گلیسین در زنجیره

انتهای کربوکسی Atg12 به وسیله E1 Like Atg7 از طریق پیوند پر انرژی وابسته به ATP فعال

می‌شود. Atg12 به Atg10 E2Like منتقل می‌شود و به لیزین ۱۴۹ Atg5 متصل می‌شود. کونزوگه

Atg5-Atg12 برای شکل‌گیری کمپلکس Atg5-Atg12- Atg16L1 با Atg16L1 تعامل می‌کند.

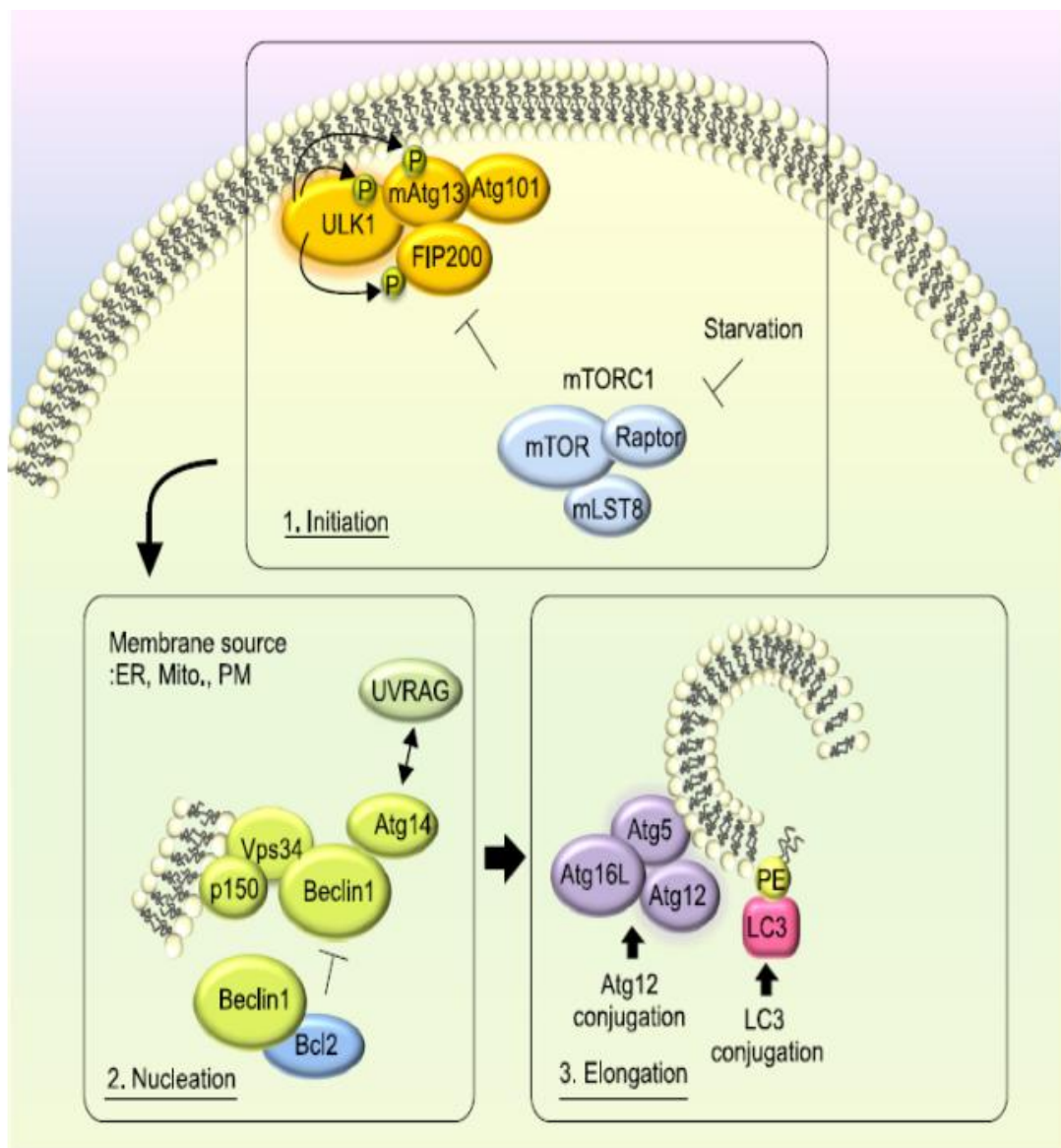
دومین سیستم کونزوگه تغییردر LC3 به وسیله فسفولیپید فسفاتیدیل اتانول آمین یک فرآیند

اساسی در شکل‌گیری اتوفاگوزوم است. LC3 به وسیله Atg4 سیستئین پروتئاز شکسته می‌شود و با PE

به وسیله 3 Atg، Atg7، E2-like enzyme کونژوگه می‌شود. LC3 II همراه با لیپید سپس در شکل گیری غشاهای اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. تبدیل LC3 به LC3 II به عنوان نشانه ای در القاء اتوفاژی می‌باشد.

۱-۶-۱-۴. تکامل وزیکول و تخریب لیزوزومی:

اتوفاگوزوم به لیزوزوم برای تکمیل مسیر اتوفاژی متصل می‌شود و اتوفاگولیزوزوم ایجاد می‌شود. سپس غشای داخلی اتوفاگوزوم به وسیله هیدرولاز لیزوزوم داخل اتوفاگوزوم تخریب می‌شود. در مطالعات اخیر تنظیم کننده‌های بلوغ اتوفاژی مثل شناسایی شده اند [۵۷].



شکل ۱-۲ تنظیم مولکولی شکل گیری اتوفاگوزوم در پستانداران. سه مرحله اصلی شامل مرحله شروع، هسته اتوفاگوزوم و گسترش غشا اتوفاگوزوم توضیح داده شده است.

۱-۶-۲. تنظیم اتوفاژی در بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون با کاهش پیشرونده دوپامین در سلول‌های مغزی در نیگرواستریاتال مشخص می‌شود که مشخصه اصلی آن وجود لوئی بادی‌ها، انکلوزیون‌های سیتوپلاسمی اتوزینوفیلی و گرد در هسته نورون‌ها می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که اجسام لوئی بادی شامل تجمعی از α -synuclein می‌باشد. این پروتئین در مغز به فراوانی یافت می‌شود و عمدتاً در غشاهای پیش سیناپسی بیان می‌شود. دوجاهش در α -synuclein A53T و A30P در ایجاد زودرس پارکینسون موثر می‌باشد. در حدود ۹۵٪ موارد ابتلا به بیماری پارکینسون اسپورادیک هستند یعنی علتشان ناشناخته است. شش ژن مرتبط با بیماری پارکینسون شامل SNCA (a-synuclein)، DJ-1، LRRK2، PINK1، PARKIN، ATP13A2 شناسایی شده است. جهش در ژن SNCA، DJ-1 بسیار نادر است. ولی جهش در LRRK2، PINK1، PARKIN در ۳٪ بیماران مشاهده شده است. الگوی توارث در SNCA، LRRK2 اتوزومی غالب و در ژن‌های DJ-1، PINK1، PARKIN اتوزومی مغلوب است.

ژن SNCA رمز گذار پروتئین α -synuclein است و اولین ژنی است که ارتباط آن با بیماری پارکینسون کشف شده است. پروتئین SNCA به فور در نورون‌ها وجود دارد و احتمالاً در بلوغ و زیکول‌های پیش سیناپسی نقش دارد و به عنوان یک هماهنگ‌کننده منفی آزاد شدن نوروترانسمیتر عمل می‌کند. این پروتئین در هسته و انتهای پیش سیناپسی عصب قرار دارد ممکن است فرآیندهای التهابی در آسیب زایی نقش داشته باشد.

ماکرو اتوفاژی تنها راه تجزیه ی لیزوزومی مسئول برای نابودی SNCA نیست. SNCA می تواند از طریق CMA هم نابود شود. بنابراین SNCA توسط چاپرون HSC70 و گیرنده ی LAMP2A برای نابودی اش توسط CMA شناسایی می‌شود. جالب توجه است که هر دو شکل جهش یافته ی پاتوژنیک

SNCA یعنی A30P و A53T می‌توانند به طور قوی تر به LAMP2A متصل شوند اما نمی‌توانند وارد لیزوزوم شوند.

جهش در ژن کد کننده LRRK2 مسئول شکل غالب اتوزومال بیماری پارکینسون می‌باشد. LRRK2 عمدتاً در اجسام مولتی وزیکولار و وزیکول‌های اتوفازیک قرار دارد. جهش LRRK2 منجر به آسیب اتوفازی و تجمع پروتئین‌های مارکر اتوفازی LC3 و P62 می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده است که LRRK2 هم می‌تواند در لیزوزوم توسط CMA تجزیه شود در حالی که شکل جهش یافته‌ی رایج و پاتوزن آن (G2019S) به ندرت توسط CMA تجزیه می‌شود.

در مقایسه DJ1 به عنوان یک میانجی گر اتوزومال مغلوب PD شناسایی شده است. مطالعات اخیر همچنین یک ارتباط بین اتوفازی و DJ1 یافته‌اند، به طوری که تخلیه‌ی DJ1 در انسان (در سلول‌های نورو بلاستوما) و دروسوفیلا منجر به اختلال در عملکرد میتوکندری و آسیب اتوفازی می‌شود.

میتوفازی با ژن‌هایی که در ایجاد بیماری پارکینسون دخالت دارند در ارتباط است. مطالعات اخیر از Richard Youle و همکاران مدلی از نقش PARKIN در حذف میتوکندری‌های آسیب دیده بیان نموده‌اند. Parkin (یک لیگاز شبه E3 سیتوزولی) در استراحت عمدتاً در سیتوزول قرار دارد اما در مواقع آسیب میتوکندری، به درون میتوکندری آسیب دیده برای تخریب منتقل می‌شود. بنابراین جهش در Parkin که منجر به ایجاد بیماری پارکینسون به صورت اسپورادیک و ارثی می‌شود، توانایی پاکسازی میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفازی را مختل می‌کند. به علاوه مطالعات نشان داده‌اند که تجمع PINK1 در غشای خارجی میتوکندری نقش مهمی در انتقال PARKIN به میتوکندری آسیب دیده دارد که در نتیجه دپولاریزاسیون میتوکندری رخ می‌دهد. سپس PARKIN تعدادی از پروتئین‌های میتوکندری مانند VDAC و MFN را بر روی میتوکندری با یوبیکوئیتین نشان‌دار می‌کند و منجر به

تحریک یکی از اجزای اتوفازی P62 برای تخریب میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفازی می‌شود. علی‌رغم مطالعات گسترده، هنوز ارتباط مستقیم بین میتوفازی و علت PD آشکار نشده است.

بسیاری از مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که در بافت‌های مغزی استرس اکسیداتیو باعث از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود که در ایجاد بیماری پارکینسون موثر می‌باشد. بنابراین کاهش در استرس اکسیداتیو یک روش درمانی موثر در بیماری پارکینسون به حساب می‌آید. آنتی اکسیدان ایده آل برای PD باید هم باید قدرت فراوان در پاکسازی ROS ها و هم نقش القا کننده‌ی اتوفازی را داشته باشد زیرا سطوح معمولی از استرس اکسیداتیو برای اتوفازی لازم است. به دلیل آنکه سطح اساسی از اتوفازی ضرورتاً برای حفظ هومئوستاز نورونی لازم است، کشف عوامل درمانی که فعالیت اتوفازی را به میزان درست زیاد کنند یا مستقیماً هومئوستاز میتوکندری را حفظ کنند می‌تواند بالقوه از دست رفتن نورونی را کاهش و سرعت پیشرفت بیماری را کم کند. مطالعات نشان داده است ژن‌هایی که در ایجاد بیماری پارکینسون شرکت می‌کنند، در آسیب میتوکندری و در اتوفازی شرکت دارند.

۱-۶-۳. ژن‌های اتوفازی

۱-۶-۳-۱ P62.1

P62 /SQSTM1/A170 یک پروتئین داخل سلولی است که در اثر استرس القاء شده که در تنظیم مسیرهای انتقال سیگنال‌های مختلف درگیر در بقای سلولی و مرگ سلول شناخته شده است. یک پروتئین داربست با چندین بخش می‌باشد که عملکرد آن در انتقال سیگنال، تکثیر، بقای سلول، مرگ، تورم، تشکیل تومور و در پاسخ به استرس اکسیداتیو می‌باشد.

مطالعات اخیر نشان داده است که P62 به عنوان مرکز سیگنالینگ از طریق به کارگیری و باند مولکول‌های مهم در فرآیند سیگنالینگ برای کنترل بقاء سلول و آپتوز عمل می‌کند. به این ترتیب P62 نقش مهمی در تصمیمات سلول برای بقاء و مرگ دارد.

ساختار P62 توانایی بالقوه آن را در تعامل با سایر مولکول‌های شرکت کننده در انتقال سیگنال را آشکار می‌کند. پروتئین طولانی P62 با ۴۴۰ آمینواسید دارای domain‌های زیادی می‌باشد. یکی از این domain‌ها، domain NH2-Terminal phox and Bem 1p(PB1) می‌باشد که نمونه‌ای از تعامل پروتئین با پروتئین است که در دیگر مولکول‌های سیگنالینگ مثل atypical protein kinase C (apkc) و پروتئین par-6 وجود دارد. P62 و apkc s ها از طریق PB1 domain با هم باند می‌شوند و باعث فعال شدن آبشار رونویسی NF-KB می‌شود. به علاوه PB1 domain اولیگومرازسیون را در P62 تسهیل می‌کند که خود نقش مهمی در فرآیندهای سلولی به عهده دارد. Ubiquitin-associated domain (UBA) نقش ضروری در عملکرد P62 به عهده دارد.

P62 با TRAF6 و Caspase 8 در تعامل می‌باشد. TRAF6 alysin (k63) E3 ubiquitin ligase در تعامل با P62 فاکتور رونویسی NF-KB را فعال می‌کند و باعث بقاء سلول می‌شود. همچنین P62 تعیین می‌کند که با تجمع Caspase8 در سلول، مرگ سلول ایجاد شود [۵۸].

۱-۳-۶-۱ نقش P62 در اتوفاژی

P62 با تنظیم کننده اتوفاژی LC3/Atg8 از طریق ناحیه LC3 interacting region (LIR) باند می‌شود و تجمع می‌یابند. P62 با PB1 domain خود، فرآیند بسته بندی و انتقال پروتئین‌های تجمع یافته و بد شکل و همچنین ارگانل‌های آسیب دیده را برای پاکسازی از طریق اتوفاژی تنظیم می‌کند. P62 بقاء سلول را با دفع مواد سمی تجمع یافته برای جلوگیری از مرگ سلول تنظیم می‌کند. نقش P62

در تنظیم اتوفاژی مورد بحث است. P62 فعالیت mTORC1 را تقویت می کند و باعث مهار اتوفاژی می شود. P62 این کار را با اتصال به mTORC1 و فسفریله کردن ULK1/2 انجام می دهد. بنابراین کاهش P62 باعث غیر فعال شدن mTORC1 و فعال شدن اتوفاژی می شود [۵۷].

۱-۶-۳-۲. GAPDH

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase یا به اختصار GAPDH، آنزیمی با وزن مولکولی ۳۷ کیلودالتون می باشد که ششمین مرحله از گلیکولیز را کاتالیز می کند و در شکستن گلوکز به منظور آزاد شدن انرژی و مولکول های کربن نقش دارد. علاوه بر این عملکرد متابولیک، اخیرا معلوم گردیده که در فرایندهای غیر متابولیک نیز دخیل می باشد. از جملهی این فرایندها می توان به رونویسی، راه اندازی آپتوز، انتقال وزیکول ها از شبکه اندوپلاسمی به سمت دستگاه گلژی و انتقال سریع آکسونی اشاره کرد. از آنجایی که ژن GAPDH به صورت پایدار و سازماندهی شده به میزان زیادی در اکثر سلول ها و بافت های بدن بیان می شود، به عنوان housekeeping gene شناخته می شود. گزارش های محققان حاکی از تنظیم ژن GAPDH در شرایط خاص می باشد. به عنوان مثال فاکتور رونویسی MZF-1 نشان داده که بیان ژن GAPDH را تنظیم می کند. GAPDH می تواند رونویسی را فعال کند. GAPDH بین سیتوزول و هسته حرکت می کند و در نتیجه ممکن است سوخت و ساز بدن را با رونویسی مرتبط کند. GAPDH به عنوان یک پروتئین خاص متصل شونده به mRNA با سکانس 5'-URT یا 3'-URT در mRNA بر هم کنش می کند که برای تنظیم ترجمه در بیان ژن مهم است.

در سال ۲۰۰۵، حرا و همکاران نشان دادند که GAPDH در شروع آپتوز شرکت می کند. GAPDH به DNA متصل و به شروع رونویسی کمک می کند. مطالعه نشان داد که GAPDH در نیتروسلاسیون S- توسط NO در پاسخ به استرس شرکت می کند و باعث اتصال آن به پروتئین SIAH1 که یک لیگاز

یوبیکوئیتین است می‌شود. در نتیجه این کمپلکس به هسته که آن در پروتئین هدف Siah1 قرار دارد برای تخریب می‌رود. نیتروسلاسیون S- را مهار می‌کند و در نتیجه به عنوان یک دارو استفاده می‌شود.

LC3.۳-۳-۶-۱

Atg8 در مخمر در تشکیل اتوفاگوزوم ها شرکت می‌کند. حداقل سه خانواده از پروتئین های پستانداری مرتبط با Atg8 به نام های LC3 ، GATE16 و GABARAP وجود دارد. سه زیر شاخه ی انسانی LC3(light chain 3) شامل LC3 A ، LC3 B و LC3 C هستند. تصور می‌شود LC3 ارتولوگی از Atg8 است. LC3 در غشاهای اتوفاگوزومی قرار می‌گیرد. عملکرد و محل دقیق دو همولوگ دیگر مشخص نیست. GABARAP ممکن است در GABA-receptor clusterin یا انتقال دخالت داشته باشد. GATE16 تنظیم کننده ی انتقال درون گلژی است که با NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) و Golgi v- SNARE GOS-28 بر هم کنش می‌کند. هر سه همولوگ Atg8 یک GLy حفاظت شده نزدیک به انتهای C خودشان دارند که با PE-acceptor site در Atg8 مخمر مطابقت می‌کند. LC3 بعد از GLy120 در مدت شش دقیقه از سنتز در سیتوپلاسم شکافته می‌شود، در نتیجه LC3 I سیتوزولی که ۱۸ کیلو دالتون است تولید می‌شود. سپس زیر مجموعه ای از LC3 I تبدیل به LC3 II می‌شود که یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی است و در اتوفاژی که اتوفاگوزوم محتویات سیتوزولی مثل پروتئین ها و ارگانل های آسیب دیده را در برمی گیرد، همزمان این فرم سیتوزولی LC3 (LC3 I) به فسفاتیدیل اتانل آمین کونژوگه شده و به شکل LC3- (LC3 II) فسفاتیدیل اتانل آمین کونژوگه که در شکل گیری غشای اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. اتوفاگوزوم به لیزوزوم متصل می‌شود، اتوفاگولیزوزوم تشکیل می‌شود و اجزای درون اتوفاگوزوم توسط آنزیم های هیدرولاز تخریب می‌شود و اتوفاژی را القا می‌کند. تبدیل LC3 به LC3 II به عنوان نشانه ای در القاء اتوفاژی می‌باشد. تشکیل LC3 II بستگی به Atg7 و Atg3 پستانداری دارد و همچنین به Atg5 و اتصال با Atg12 بستگی دارد . مطالعات اخیر نشان داده است که LC3 I تحت تاثیر محرومیت غذایی، کاهش اکسیژن و شیمی درمانی

به LC3 II تبدیل می‌شود که در غشای اتوفاگوسوم قرار می‌گیرد در نتیجه LC3 II در سلول القاء اتوفاژی را منجر می‌شود.

Atg12.۴-۳-۶-۱

Atg12 یک پروتئین با ۱۸۶ آمینواسید است که با Atg5 کونژوگ می‌شود. گلیسین در زنجیره انتهایی کربوکسی Atg12 به وسیله Atg7 E1 Like از طریق پیوند پر انرژی وابسته به ATP فعال می‌شود. Atg12 به Atg10 E2Like منتقل می‌شود و به لیزین ۱۴۹ Atg5 متصل می‌شود. کونژوگ Atg5- Atg12 برای شکل‌گیری کمپلکس ATG5-ATG12-Atg16L1 با Atg16L1 تعامل می‌کند. سیستم کونژوگ یوبیکوئیتین Atg5-Atg12-Atg16L1 می‌باشد که برای شکل‌گیری اتوفاگوزوم اولیه ضروری می‌باشد.

Atg5.۵-۳-۶-۱

Atg5 یک E3 ubiquitin ligase است که نقش ضروری در مرحله گسترش اتوفاگوزوم در اتوفاژی به عهده دارد که به وسیله ی Atg7 فعال می‌شود و کمپلکس Atg12-Atg16L1 را ایجاد می‌کند و این کمپلکس برای کونژوگ LC3 I با PE و تشکیل LC3 II ضروری می‌باشد .

Atg16L1.۶-۳-۶-۱

Atg16L1 نقش اساسی در اتوفاژی بازی می‌کند. تعامل Atg16L1 با Atg5-Atg12 واسطه ی کونژوگ فسفاتیدیل اتانل آمین با LC3، باعث تولید شکل فعال LC3 به LC3 II می‌شود و در نتیجه گسترش غشای اتوفاگوزوم را کنترل می‌کند.

Atg10 یک آنزیم شبیه E2 است که در شکل‌گیری اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. Atg10 با Atg7 برای دریافت Atg12 که یک مولکول یوبیکوئیتین است تعامل می‌کند که در واکنش کونژوگه Atg5-Atg12 شرکت می‌کند و در شکل‌گیری اتوفاگوزوم دخالت می‌کند [۱۷].

فصل دوم

مروری بر متون

۲-۱. بررسی متون

بیماری پارکینسون دومین اختلال نورودژنراتیو رایج بعد از بیماری آلزایمر می‌باشد. علائم حرکتی این بیماری شامل: لرزش، سفت شدگی عضلات، برادی کینز (آهستگی حرکات) و اختلال در راه رفتن می‌باشد. چند علامت غیر حرکتی پارکینسون نارسایی اتونومیک، اختلال افسردگی، اختلال بویایی، سایکوز و آشفتگی در خواب می‌باشد. فقدان نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه مسئول ایجاد علائم حرکتی بیماری پارکینسون می‌باشد [۱،۴].

مدارک نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد میتوکندری، تجمع پروتئین‌ها و استرس اتوفاژیک در تخریب نورون‌های دوپامینرژیک و پاتوژنیز بیماری‌های نورودژنراتیو موثر می‌باشند [۵].

بیماری پارکینسون در ۹۰٪ موارد بدون علت می‌باشد. اگر چه ریسک فاکتورهای محیطی در آن دخیل می‌باشد. ریسک فاکتورهای محیطی مطرح شده برای بیماری پارکینسون شامل صنعتی شدن، زندگی روستایی، در معرض فلزات سنگین و علف کش‌ها قرار گرفتن می‌باشد. مطالعه روی دوقلوها از علت ژنتیک در شروع این بیماری در سنین بالاتر خبر می‌دهد [۲]. براساس مطالعات اپیدمیولوژیکی سن مهمترین ریسک فاکتور در پیشرفت بیماری پارکینسون می‌باشد [۳].

اقدام درمانی موثر که بتواند نورودژنراسیون را در بیمارانی که از این بیماری رنج می‌برند متوقف کند هنوز در دسترس نیست درمان محافظت کننده در برابر فقدان نورون‌ها در حال حاضر وجود ندارد. ورزش به طور کلی ایمن و بدون هزینه می‌باشد و به عنوان درمان علائم حرکتی این بیماری به شمار می‌رود. بیماری پارکینسون عمدتاً با لوودوپا که جایگزین فقدان دوپامین است درمان می‌شود [۶].

Ana Maria و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که سلول‌ها سیستم‌های کارآمدی برای دفع قطعات اکسیژن و نیتروژن دارند. زمانی که قطعات اکسیژن و نیتروژن فعال اضافی وجود داشته باشد که تعادل را بین تولید و برداشت آن‌ها برهم زند، شرایط پاتولوژیکی مثل بیماری پارکینسون و دیگر بیماری‌های سیستم عصبی ایجاد می‌شود.

Alves-Rodrigues و همکاران در سال ۱۹۹۸ بیان نموده‌اند که استرس اکسیداتیو در بیماری‌های نورودژنراتیو باعث ایجاد پروتئین‌های بدشکل شده که در داخل سیتوپلاسم منجر به تشکیل تجمعات پروتئینی می‌شوند. برای مثال a- سینوکلئین و پارکین پروتئین‌های اصلی تجمعات پروتئینی در بیماری پارکینسون می‌باشند.

Davie CA و همکاران در سال ۲۰۰۸ اظهار نموده‌اند که اتوفاژی نقش فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیک زیادی در انطباق باگرسنگی، پاکسازی پروتئین‌های داخل سلولی، ضد پیری، از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، مرگ سلولی، سرکوب تومور، معرفی آنتی ژن دارد.

Mizushima و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده‌اند که اتوفاژی نقش مهمی در تکامل و تمایز سلولی به عهده دارد که اختلال در مسیر اتوفاژی و تغییر در ژن‌های وابسته به اتوفاژی در ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو مثل آلزایمر، پارکینسون و بیماری هانتینگتون، انواع مختلف سرطان‌ها، چاقی، پیری و بیماری‌های عفونی موثر می‌باشد.

تاکنون بسیاری از ژن‌های مرتبط با اتوفاژی شناخته شده‌اند و جهش در برخی از آن‌ها با بیماری پارکینسون در ارتباط است. اخیراً تعدادی مطالعه مبنی بر دخالت دو پروتئین Parkin و PINK1 و جهش در آن‌ها در ایجاد بیماری پارکینسون موثر می‌باشد [۱۰].

Pramstaller PP و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان نموده اند که Parkin در نورون‌ها وجود دارد و به عنوان یک لیگاز وابسته به یوبیکوئیتین در تخریب پروتئوزومی پروتئین‌های هدف نقش دارند. جهش‌های گوناگون از راه‌های متفاوت، میزان انحلال، موقعیت، اتصال و خواص یوبیکوئیناسیون PARKIN را مختل می‌کنند. توان محافظت نورونی پارکین اخیراً در نمونه‌های حیوانی تایید شده است.

مطالعات اخیر نشان داده است PINK1 رمزگذار یک پروتئین کیناز واقع در میتوکندری است که در سرتاسر مغز انسان وجود دارد. PINK1 نقش محافظت نورون دارد و این عمل را با فسفوریلاسیون برخی از پروتئین میتوکندری انجام می‌دهد. جهش در ژن باعث کاهش پتانسیل غشا میتوکندری در شرایط تنش می‌شود.

Ana Maria و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان نموده اند که Parkin به طور انتخابی در تخریب میتوکندری به وسیله PINK1 استفاده می‌شود و جهش در این ژن در ایجاد بیماری پارکینسون اثری دخالت دارد. بنابراین آسیب به میتوکندری باعث تجمع PINK1 در نتیجه آن Parkin در میتوکندری باعث القای میتوفاژی می‌شود.

Jisun lee و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کرده اند که اجسام لوئی شامل تجمع پروتئین آلفا-سینوکلئین، پروتئین‌های یوبیکوئیتین و ناجور تشکیل شده است. جهش در بیان آلفا-سینوکلئین اتوفاژی را فعال می‌کند، که در پاتوژنز این بیماری موثر می‌باشد.

Bandyopadhyay و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده اند که بررسی‌های اخیر از مدل‌های حیوانی و سلولی بیماری پارکینسون، دخالت پروتئین‌هایی مثل آلفا سینوکلئین و LRRK2 در مسیر اتوفاژی، به طور ژنتیکی در ارتباط با بیماری پارکینسون اتوزومال غالب است را پیشنهاد می‌کنند.

P62 یک پروتئین چند منظوره شامل چندین حوزه تعامل پروتئین-پروتئین است. از تعاملات p62 درگیر در تنظیم سیگنالینگ سلولی و انتقال پروتئین، تجمع و تخریب است. پروتئین p62 می تواند از طریق جایگاه UBA آن به پروتئین ubiquitinated متصل شده و تجمع و تخریب خود را از طریق یا اتوفاژی و یا proteasomes کنترل کند. پروتئین P62 در ارتباط با اجزاء داخل سلولی در tauopathies اولیه و ثانویه، α -synucleinopathies و دیگر اختلالات عصبی مغز نمایش اجزاء با پروتئین misfolded دیده می شود .

Duran و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند که P62 به عنوان مرکز سیگنالینگ از طریق به کارگیری و باند مولکول های مهم در فرآیند سیگنالینگ برای کنترل بقاء سلول و آپتوز عمل می کند. به این ترتیب P62 نقش مهمی در تصمیمات سلول برای بقاء و مرگ دارد. P62 نقش مهمی در عملکرد سلول مانند استخوان سازی، چاقی و سرطان دارد.

Kuusisto و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیان نموده اند که مرگ سلول های عصبی و اختلال در عملکرد پروتئازوم باعث تجمع پروتئین های یوبیکوئیتین و بدشکل می شود و باعث افزایش بیان P62 به وسیله حضور در این تجمعات پروتئینی می شود که به وسیله متمرکز کردن این تجمعات پروتئینی باعث حفاظت سلول ها می شود.

مطالعات اتوفاژی اخیر نشان داده است که P62 جزئی از اتوفاژی است که به عنوان گیرنده اتوفاژی برای پروتئین های تجمع یافته، ارگانل های آسیب دیده و همچنین برای میکرومها می باشد. P62 در شرایط فیزیولوژیکی نقش مهمی در حفظ هموستاز متابولیک دارد که اساس آن بر روی موش های (knock out) می باشد [۱۱].

Antero Salminen و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که در بیماری آلزایمر، پروتئین P62 از نوروفیبريلاتوری که عمدتاً از پروتئین تاو هیپر فسفولیپیدی و یوبیکوئیتین تشکیل شده است. شواهد نشان می دهد که P62 نقش مهمی در تخریب پروتئین تاو به عهده دارد. مطالعات اخیر نشان داده اند که بیان ژن P62 و سطوح پروتئین P62 سیتوپلاسمی به میزان قابل توجهی در قشر پیشانی بیماران آلزایمر کاهش می یابد. کاهش سطح پروتئین P62 می تواند مسیرهای سیگنالینگ NRF2 به AMP حلقوی و NF-kB مختل و باعث افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال بقای نورون ها شود.

Braak و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که P62 در بیماری پارکینسون از نورون های عصبی به وسیله تخریب پروتئین های بدشکل و جلوگیری از تشکیل تجمعات پروتئینی حفاظت می کند. Jorge Moscat و همکاران در سال ۲۰۰۹ اظهار نموده اند که نقص در اتوفاژی باعث تجمع P62 و پیشرفت تومورنریس می شود. اتوفاژی و آپوپتوز ناقص سلول های تومور و استرس متابولیک منجر به تجمع P62 ، آسیب به میتوکندری و ایجاد قطعات فعال اکسیژن می شود.

Takujiro Homma و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان نموده اند که بیماری پریون اختلالات عصبی کشنده در ارتباط با تبدیل کنفورماسیونی پروتئین نرمال سلولی پریون به پروتئین بیماری زا پریون می باشد. در این تحقیق گزارش شده است که تخریب پروتئین های بیماری زا پریون توسط فعال کردن اتوفاژی انجام می شود و بیان p62 تجمع پروتئین های بیماری زا پریون را کاهش می دهد و یک گزینه درمانی برای این بیماری می باشد.

Jong Ok Pyo و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان نموده اند که سیستم کونژوگ یوبیکوئیتین Atg5 - Atg12 - Atg16L1 برای شکل گیری اتوفاگوزوم اولیه ضروری می باشد. گلاسیپین در زنجیره انتهایی کربوکسی Atg12 به وسیله E1 Like Atg7 از طریق پیوند پر انرژی وابسته به ATP فعال می شود.

Atg12 به Atg10 E2Like منتقل می شود و به لیزین ۱۴۹ Atg5 متصل می شود. کونژوگه Atg5-Atg12 برای شکل گیری کمپلکس Atg5-Atg12-Atg16L1 با Atg16L1 تعامل می کند.

Mehrdad Alirezaei و همکاران در سال ۲۰۰۹ به این نتیجه رسیده اند که بیان ژن اتوفاژی Atg5 منجر به بقاء و تکثیر سلول های T می شود. ارتباط قوی بین بیان ژن Atg5 و اختلالات حرکتی در بیماران مبتلا به MS وجود دارد. بیماری مولیپتل اسکروزیس بیماری التهاب در سیستم عصبی مرکزی است که با دمیالینه شدن سلول های T همراه است در این بیماری افزایش در تعداد و بقاء سلول های T با پیشرفت بیماری مرتبط است.

Zavodszky و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که Atg16/Atg16L1 برای اتوفاژی ضروری است زیرا لوکالیزاسیون کونژوگه ی Atg5-Atg12 رابه PAS در مخمر تنظیم می کند. Atg16L1 همچنین با FIP200 برهم کنش می کند و منجر به هدف گذاری صحیح کمپلکس Atg16L1 به محل تشکیل اتوفاگوزوم می شود و در سلول هایی که از FIP200 تخلیه شده اند، رنگ آمیزی Atg16L1 یک الگوی سیتوپلاسمی پراکنده را نشان می دهد.

Hampe J و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده اند که بیان ژن اتوفاژی Atg16L1 ریسک فاکتوری در پیشرفت بیماری کرون می باشد. کمبود Atg16L1 در سلول ها که باعث تجمع میکروبی های درون سلولی، مانند سالمونلا و شیگلا می شود. در طول زمان نشان می دهد که Atg16L1 تکثیر میکروبی های داخل سلولی را متوقف می کند که نقش Atg16L1 در تشکیل غشا اطراف میکروبی ها در فرآیند تخریب اتوفاژی همراه با LC3 نشان می دهد.

Tatsuya و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند که اکثر موش هایی که از نظر داشتن Atg16L1 نقص داشتند یک روز بعد از تولد مردند که نشان دهنده ی اینست که Atg16L1 برای بقا در طول

گرسنگی نوزاد (neonatal starvation) ضروری است. در این موش‌ها اتصال LC3 به PE به ندرت مشاهده می‌شود Zavodszky و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که در فیبروبلاست موش‌هایی که نقص در داشتن Atg16L1 داشتند، کمپلکس Atg5-Atg12 به ندرت مشاهده می‌شود و اتوفاگوزوم‌ها نمی‌توانند تشکیل شوند و این منجر به تجمع پروتئین‌های با عمر طولانی و تجمع P62/SQSTM1 می‌شود.

Serhiy Pankiv و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان کردند که P62 به طور مستقیم با پروتئین‌های موثر در اتوفاژی LC3I و LC3 II باند می‌شود که این فرآیند برای تخریب اتوفاژیک اجسام سیتوپلاسمی که شامل پروتئین‌های یوبیکوئیتین می‌باشد ضروری می‌باشد.

Emma Deas و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که LC3I تحت تاثیر محرومیت غذایی، کاهش اکسیژن و شیمی درمانی به LC3 II تبدیل می‌شود که در غشای اتوفاگوم قرار می‌گیرد در نتیجه LC3 II در سلول القاء اتوفاژی را منجر می‌شود.

Atg10 یک آنزیم E2- Like است که در شکل‌گیری اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. Atg10 با Atg7 برای دریافت Atg12 که یک مولکول یوبیکوئیتین است تعامل می‌کند که در واکنش کونژوگه - Atg12 Atg5 شرکت می‌کند و در شکل‌گیری اتوفاگوزوم دخالت می‌کند [۱۷].

Nemoto و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که Atg10 یک آنزیم E2- Like که در دو فرآیند اصلاحی کونژوگه Atg 5-Atg 12 و تغییر فرم LC3 در اتصال به غشا برای شکل‌گیری اتوفاگوزوم شرکت می‌کند.

Yoon Kyung Jo و همکاران در سال ۲۰۱۲ اظهار نموده اند که بیان ژن Atg10 در ارتباط با متاستاز گره لنفاوی و عروقی لنفاوی در سرطان رکتال مشاهده شده است. مطالعات اخیر نشان داده است

که خود تنظیمی منفی ژن‌های Atg، در توسعه تومور به صورت مستقیم و غیر مستقیم دخالت می‌کند. کاهش میزان اتوفاژی التهاب وابسته به نکروز و توسعه تومور را افزایش می‌دهد. با این حال، مطالعات دیگر نشان داده‌اند که افزایش اتوفاژی همچنین می‌تواند به توسعه تومور کمک کند. در واقع، اتوفاژی بقای سلول را با تنظیم تعادل متابولیک ترویج می‌دهد. سلول‌های تومور باید برای زنده ماندن در هیپوکسی و از سلول‌های اطراف تفکیک شوند. بنابراین، اتوفاژی می‌تواند تومور و متاستاز را با افزایش بقای سلول‌های تومور افزایش دهد.

Orsi A و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند که GAPDH شانس بقای سلول را با افزایش گلیکولیز بالا می‌برد. همچنین بیان ژن‌های دخالت کننده در اتوفاژی را برای مثال Atg12 به صورت مستقیم یا غیر مستقیم افزایش می‌دهد.

Bae BI و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که GAPDH با پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌های دژنراتیو مثل هانتینگتین و B-amyloid کمپلکس‌هایی را ایجاد می‌کند. از این رو نقش مستقل آن در تولید انرژی اهمیت زیادی در بیماری‌های نورودژنراتیو مخصوصاً در بیماری آلزایمر به خاطر شکل‌گیری کمپلکس‌های پروتئینی B-APP دارد که نتیجه آن کاهش گلیکولیز می‌باشد.

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱. ابزار و مواد

۳-۱-۱. ابزار آلات:

موش صحرایی نر-دستگاه استریوتاکس - ترازوی دیجیتال- دستگاه ترمو بلاک- دستگاه ترمو سایکلر-سانتریفیوژ-دستگاه نانو دراپ-استوانه شیشه ای به ابعاد قطر=۳۳ سانتیمتر، ارتفاع =۲۵ سانتیمتر - دریل مخصوص سرنگ هامیلتون ۵ یا ۱۰ میکرولیتری -ست جراحی- پنبه، گاز و نخ بخیه- ذره بین- تیغ معمولی- سرنگ انسولین- رک سر سمپلر، سر سمپلر زرد و آبی و کریستالی، میکروتیوب ۱/۵ میلی، میکروتیوب ۰/۵ میلی میکروتیوب ۰/۲ .

۳-۱-۲. مواد لازم:

نروتوکسین 6-OHDA -آپومورفین- پودر اسید اسکوربیک- کتامین -گزیلازین - الکل ۷۰ درصد- بتادین- نرمال سالین- DEPC - water nuclease free -کیت استخراج RNA- ژل آگارز-پرایمر - محلول ETA- کیت سنتز DNA Ladder 100bp- Gene Ruler - red Taq Master mix- CDNA - Superior Gel Red -DNA I tretment -

۳-۲. گروه‌های مورد بررسی:

به منظور انجام مطالعات بافتی و رفتاری مدارنگیر و استریاتال در مدل آزمایشگاهی پارکینسون از ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (vistar rat) به وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم که از مرکز رازی (کرج) تهیه شد استفاده گردید. حیوانات در گروه‌های ۴ تا ۶ تایی در قفس و محیط با دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتیگراد و شرایط نور و تاریکی یکسان در ۲۴ ساعت تیمار شده و بدون محدودیت به آب و غذای مخصوص

(pelted) دسترسی داشته و برای انجام آزمایشات و سازگاری با محیط یک ماه قبل به حیوانخانه منتقل شدند.

دسته بندی گروهها

حیوانات بصورت تصادفی به ۳ گروه زیر دسته بندی می شوند:

الف - شام (SHAM-operated group)

ب- تخریب (lesion - group)

ج- کنترل

۳-۳. ارزیابی رفتاری قبل از آزمایش:

بررسی رفتاری توسط داروی آپومورفین هیدروکلراید شرکت (sigma) به میزان ۵ mg/kg. به شکل داخل صفاقی توسط سرنگ انسولین یک هفته قبل از جراحی (base line) انجام شد. آپومورفین به صورت پودر است که آن را در محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد به میزان ۳ CC / ۰ حل می کنیم. موشها ۱۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش در محفظه استوانه ای مدرج شفاف به نور از جنس شیشه یا پلاستیک خشک، با ابعاد قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی متر نگهداری شدند. پس از تزریق دارو تعداد چرخش کامل ۳۶۰ درجه در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه ای به مدت ۶۰ دقیقه بصورت دستی اندازه گیری شد. در مدت آزمایش حیوانات تنها به آب دسترسی داشتند. تعداد چرخش کونترولترال (به سمت مخالف محل ضایعه به سمت راست) به عنوان عدد مثبت و چرخش ایپسی لترال (به سمت چپ یا محل ضایعه) بعنوان عدد منفی در نظر گرفته شد تعداد خالص چرخش پس از تفاضل چرخشها در دو جهت محاسبه گردید. این ارزیابی رفتاری چهار هفته پس از ایجاد ضایعه و قبل از بیهوش کردن حیوان جهت انجام پرفیوژن و خارج

ساختن مغز برای هر موش تکرار می‌شود و آنالیز رفتاری پس از مصاحبه آماری بصورت رفتار چرخش القا شد بر اثر آپومورفین قبل بعد از جراحی بررسی شد.

۳-۴. جراحی

موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین و گزیلازین به ترتیب ۱۰۰ و ۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم بیهوش شده، سپس در دستگاه استریو تاکس با مختصات تنظیم شده قرار می‌گیرند. مختصات دستگاه برای ایجاد ضایعه بر روی ۳ mm لترال به سمت چپ، ۴/۵ mm شکمی از سطح سخت شامه و ۹/۲ mm قدامی خلفی نسبت به فاصله بین دو گوش (interural) تنظیم می‌شود. همچنین میله دندانی ۳/۳ (incisor bar) میلی‌متر زیر سطح افق قرار می‌گیرد. برای انجام جراحی و یافتن مختصات و سایر مراحل مانند شمارش نورونی و ... قبل از انجام اعمال یادشده از اطلس & paxinos Watson استفاده می‌شود. بجای مختصات ۹/۲+ میلی‌متر قدامی - خلفی نسبت به اینتراورال می‌توان ۰/۲mm+ قدامی خلفی نسبت به برگما مد نظر قرار داده، زیرا در موش ۲۹۰ گرمی نژاد ویستار فاصله بین خط اینتراورال و برگما برابر ۹ میلی‌متر است. پس از فیکس کردن سر حیوان در دستگاه، با تیغ و قیچی معمولی کرک‌های سر حیوان را پاک کرده تا پوست در معرض دید قرار گیرد، پس از ضد عفونی کردن محل جراحی با بتادین، بوسیله تیغ جراحی شکافی موازی با سطح ساژیتال از محل فاصله بین چشم‌ها تا ناحیه فاصله بین گوش‌ها ایجاد کرده و پوست سر کنار زده می‌شود پس از پیدا کردن مختصات، استخوان محل تزریق توسط دریل مخصوص با سرعت پایین جهت جلوگیری از آسیب به بافت مغزی سوراخ می‌شود پس از نمایان شدن سطح سخت شامه تزریق بوسیله سرنگ‌ها ۵ یا ۱۰ میکرولیتری صورت می‌گیرد که ماده تزریق شده در گروه‌های مختلف متفاوت است:

الف- در استریاتوم چپ حیوانات گروه تخریب (lesion) ۵ میکرولیتر از محلول نرمال سالین ۰/۹٪ حاوی ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر از نروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین هیدروکلراید hydroxyl dopamine (6-OHDA) sigma USA hydrochlorid و اسید اسکوربیک ۰/۲٪ تزریق شد.

ب- در استریاتوم چپ حیوانات گروه شم ۵ میکرولیتر محلول نرمال سالین ۰/۹٪ حاوی اسید اسکوربیک ۰/۲٪ تزریق شد.

بی‌هوشی :

برای تهیه داروی بی‌هوشی از مخلوط کتامین ۱۰۰ mg/kg گزیلازین ۵ mg/kg استفاده می‌شود. به عنوان نمونه برای موش صحرایی ۲۰۰ گرم از ویال کتامین ۱۰٪ که حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم کتامین در هر یک سی سی می‌باشد به میزان ۰/۲ سی سی که معادل ۲ واحد سرنگ انسولین است (هر سرنگ انسولین ۱ CC برابر ۱۰ واحد است) کشیده می‌شود، در مورد گزیلازین هم میزان آن یک بیستم مقدار کتامین است (این نسبت براساس mg/kg است نه حجمی زیرا ویال‌های کتامین و گزیلازین در درصدهای مختلفی ارائه می‌شوند). رعایت نسبت اختلاط و دوز بی‌هوشی به گونه ای باشد که موش‌ها تا قبل از اتمام جراحی به هوش نیایند در صورت به هوش آمدن می‌توان یک یا دو واحد دیگر داروی بی‌هوشی به حیوان تزریق کرد.

آپومورفین

آپومورفین بصورت پودر است که آنرا در محلول نرمال سالین ۰/۹٪ با غلظت ۰/۵ mg/kg تهیه و بصورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق می‌شود. در صورت ایجاد ضایعه در سمت چپ استریاتوم، پس از پایان هفته چهارم آپومورفین سبب القا چرخش به سمت راست (مختلف ضایعه) می‌شود این چرخش چند دقیقه پس از تزریق آپومورفین صورت می‌گیرد.

نرمال سالین. ۰/۹

برای تهیه یک لیتر از این محلول کافیت ۰/۹ گرم NaCl را در یک لیتر آب مقطر حل شود این محلول بصورت آماده در بسته بندی‌های نیم لیتر به بالا بصورت استریل در داروخانه ها موجود می‌باشد.

سالین اسکوربات

برای تهیه ۱۰۰ cc از این محلول کافیت ۰/۲ گرم پودر اسید اسکوربیک در ۱۰۰ cc نرمال سالین. ۰/۹ حل شود که البته این مقدار محلول بیش از حد نیاز است.

6-OHDA

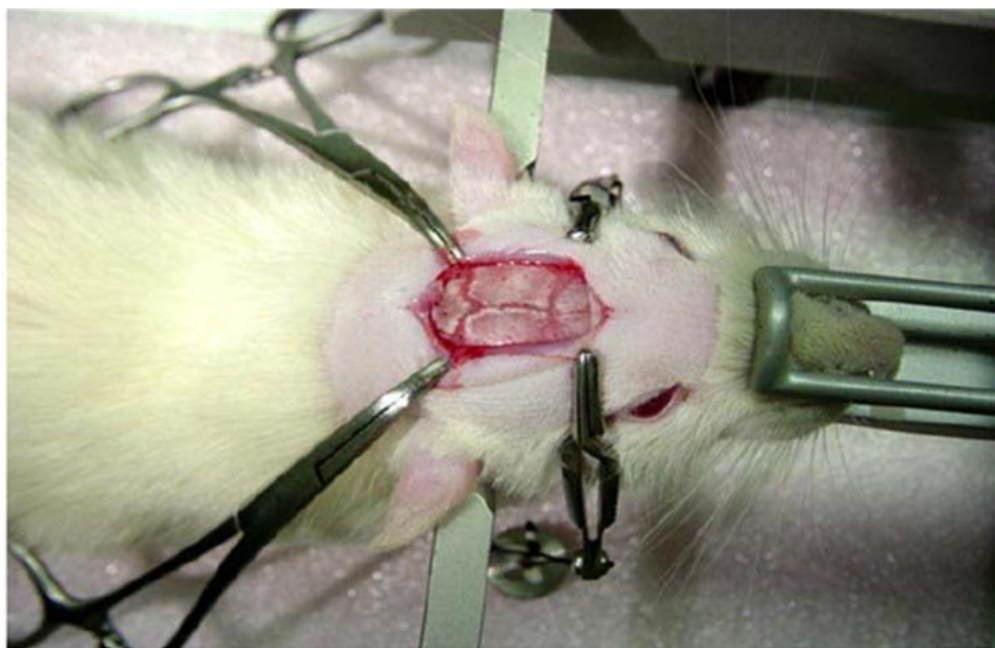
آماده کردن نروتوکسین در محیط ترجیحا تاریک یا حداقل روشنایی با نور غیر مستقیم صورت می‌گیرد. برای هر موش ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر از پودر 6-OHDA در سالین اسکوربات حل می‌شود و از آنجائیکه حجم تزریقی در استریاتوم برای هر موش ۵ میکرولیتر معادل یک سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری است، ۱۲/۵ میکروگرم از 6-OHDA در ۵ میکرولیتر حل می‌شود. در صورت عدم دقت ترازوی دیجیتالی و دیگر اینکه هر ویال 6-OHDA حاوی حداقل ۱۰۰ mg پودر است که برای ایجاد ضایعه در ۴۰ هزار موش صحرایی کافی است می‌توان میزان بیشتری از محلول نروتوکسین ایجاد کرد و سپس مقدار مورد نظر را برداشت کرد. برای مثال ۱ mg (۰/۰۰۱ گرم) پودر 6-OHDA را در میکروتیوب حاوی ۰/۴ میلی لیتر (۴ واحد سرنگ انسولین) حل کرد. به دلیل حساسیت بالای دارو به نور میکروتیوب و سرنگ هامیلتون در فویل آلومینیومی پیچیده می‌شوند نروتوکسین بصورت تازه تهیه و مصرف می‌شود. در صورت سالم بودن نروتوکسین رنگ آن شفاف است اما در صورت فاسد شدن رنگ آن متمایل به قرمز می‌شود.

روش تزریق نروتوکسین:

به آهستگی و سرعت تزریق به داخل استریاتوم به میزان یک میکرولیتر در دقیقه است و ۵ الی ۱۰ دقیقه پس از تزریق سرنگ به آهستگی خارج می‌شود. اولاً تا نروتوکسین به آرامی جذب شود و ثانیاً از خروج ماده از استریاتوم به دنبال خارج کردن سرنگ جلوگیری شده باشد. پس از پایان تزریق محل انجام جراحی و پوست سر موش ضد عفونی و سپس بخیه می‌شود. در تمام طول جراحی چشمان حیوان توسط پارچه نمدار و خیس برای محافظت چشم حیوان از خشک شدن و آسیب پوشید شود. حیوان پس از اتمام کار به علت پائین آمدن دمای بدن در جای گرم نگهداری می‌شود و پس از به هوش آمدن به حیوانخانه منتقل می‌شوند.



شکل ۱-۳ : موش‌ها را بعد از بیهوش کردن در داخل دستگاه استرنوتاکس قرار می‌دهیم.



شکل ۳-۲: محل مورد نظر تزریق نشانه گذاری می شود.



شکل ۳-۳: سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده و با استفاده از سرنگ هامیلتون محلول حاوی سم نوروتوکسیک 6-OHDA به ناحیه استریاتوم تزریق می‌شود. سم 6-OHDA به آهستگی و ظرف ۵ دقیقه تزریق می‌شود. در پایان سرنگ بعد از ۵ دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی و با سرعت ۱ mm/min از مغز بیرون آورده می‌شود.

۳-۵. بررسی بیان ژن به وسیله واکنش پلیمرز معکوس (RT-PCR)

برای انجام RT-PCR ابتدا پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم افزار Gene Runner طراحی گردید و سپس از شرکت ژن فناوریان تهیه گردید. در طراحی پرایمر از پرایمرهایی با طول ۲۱-۱۸ نوکلئوتید و ترکیب نوکلئوتیدی با الگوی ۵۰-۶۰ درصد GC و ۴۰-۵۰ درصد AT استفاده گردید. همچنین باز انتهای ' ۳ از انواع C ، G ، GC یا CG طراحی گردید تا احتمال ایجاد اشکالاتی همچون سنجاق سر و دایمر پرایمر کاهش یابد. در این تکنیک RNA کل از سلول‌های هر گروه به وسیله کیت استخراج (Roche Biochemicals, Germany) RNA استخراج گردید. نکته مهمی که در بررسی بیان ژن به وسیله RT-PCR باید در نظر گرفته شود، عدم وجود DNA ژنومی در این واکنش است، زیرا این گونه DNA می‌تواند در واکنش PCR به عنوان الگو عمل کرده و باعث ایجاد نتایج کاذب شود. بنابراین حذف DNA یکی از مراحل است که در پروتکل استخراج RNA باید وجود داشته باشد. به این منظور حذف DNA ناخواسته با استفاده از کیت (DNase I (amplification grade kit Invitrogen) صورت گرفت. سپس RNA با استفاده از کیت تولید cDNA (MBI Fermentas, Lithuania) و آنزیم کپی برداری معکوس به DNA مکمل (cDNA) تبدیل شد. سپس cDNA حاصله به روش PCR تکثیر شده، مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج RNA

استخراج RNA از بافت ها و رده‌های سلولی با روش‌های گوناگون نیاز به چهار مرحله اساسی دارد :

۱- تخریب کامل سلول یا بافت

۲- دناتوره کردن مؤثر کمپلکس‌های پروتئینی

۳- غیرفعال کردن فعالیت ریبونوکلازهای داخل سلولی

۴- تخلیص کامل RNA از سایر بیومولکول‌های سلولی

RNA ناپایدار است و از طرف دیگر حضور گسترده آنزیم بسیار مقاوم RNase در فضا، وسایل و سطوح کار، همه باعث شده است که برای کار با RNA شرایط خاصی رعایت شود. از دی اتیل-پیروکربنات (DEPC) جهت غیرفعال کردن RNase موجود بر روی وسایل، دستکش‌ها و ظروف پلاستیکی استفاده می‌شود. این ماده فعالیت عوامل بازیک را افزایش داده و با این کار فعالیت آنزیم RNase را با اتوکسی فرمیله کردن هیستیدیل، متوقف می‌کند. محلول آبی (Sigma) DEPC ۱٪ / ۰/۱ آماده و ظروف، سرسمپلرها و میکروتیوب‌ها در این آب قرار داده شد. سپس به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و یا یک شبانه روز در دمای محیط انکوبه گردید. در مرحله بعد، به مدت ۳۰ دقیقه با دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد و آب آن‌ها خالی شد و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه با همان شرایط، اتوکلاو گردید و پس از خشک شدن، مورد استفاده قرار گرفت.

قبل از شروع به کار نیز موارد زیر رعایت گردید:

به هنگام کار باید حتماً از دستکش استفاده شود و کل فرآیند در زیر هود انجام گردید. از لوازم یک بار مصرف عاری از RNase استفاده شد. در صورت استفاده از لوازم غیریکبار مصرف، حتماً باید عاری از RNase گردند.

برای تهیه بافرها از مواد با درجه بیولوژی مولکولی و نیز آب مقطر فاقد RNase استفاده گردید. برای حذف RNase از محلول‌های مختلف می‌توان از DEPC استفاده کرد. برای استخراج RNA از سلول‌ها، از کیت استخراج RNA شرکت Roche استفاده شد.

روش کار

۱- ۰/۴ میلی لیتر از بافر lysis/binding بر روی یک میلیون رسوب سلول ریخته شد، به خوبی مخلوط گردید و در ستون مخصوص ریخته شد.

۲- مخلوط فوق به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ گردید.

سپس میکروتیوب زیر ستون با محلول در آن دور ریخته شد و میکروتیوب دیگر جایگزین شد.

۳- محلول زیرین که در میکروتیوب است و از ستون عبور کرد دور ریخته شد و به ستون $\mu\text{l DNase}$

۹۰ incubation buffer و μl ۱۰ محلول DNase I اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵-۱۵ درجه

سانتی گراد انکوبه شد.

۴- به میزان μl ۵۰۰ بافر wash buffer I به ستون اضافه گردید و مخلوط فوق به مدت ۱۵ ثانیه در

دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ گردید، سپس میکروتیوب زیر ستون با محلول در

آن دور ریخته شد و میکروتیوب دیگر جایگزین شد.

۵- به میزان μl ۵۰۰ بافر wash buffer II به ستون اضافه گردید و مخلوط فوق به مدت ۱۵ ثانیه در

دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. سپس میکروتیوب زیر ستون با محلول در

آن دور ریخته شد و میکروتیوب دیگر جایگزین شد.

۶- به میزان μl ۲۰۰ بافر wash buffer II به ستون اضافه گردید و مخلوط فوق به مدت دو دقیقه در

دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۱۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. سپس میکروتیوب زیر ستون با محلول

در آن دور ریخته شد و میکروتیوب دیگر جایگزین شد.

۷- برای استخراج RNA از ستون یک میکروتیوب جدید در زیر ستون قرار داده شد و به وسیله

μl ۵۰ از بافر elution buffer در ستون در دور ۸۰۰۰ g به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. RNA در

میکروتیوب زیرین گردآوری شد و آماده مرحله بعدی گردید.

سپس مقدار خلوص RNA¹ (OD) با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. در مواردی که مقدار خلوص ۲ بود قابل قبول ولی در مواردی که این مقدار کمتر از ۲ بود از DNase I جهت حذف آلودگی احتمالی با DNA استفاده شد.

حذف آلودگی احتمالی با DNA

از DNase I در موارد مختلفی استفاده می‌شود که عبارتند از:

حذف DNA الگو از RNA سنتز شده توسط RNA پلیمراز T7 ، T3 ، SP6 . . .

تهیه RNA فاقد DNA قبل از RT-PCR

روش کار

به ۲۰ میکرولیتر RNA تهیه شده، ۴ میکرولیتر DNase ، ۳ میکرولیتر بافر و ۳ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد (حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر). سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از پایان انکوباسیون، ۴ میکرولیتر EDTA ۲۵ میلی مولار اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. باید توجه داشت که RNA در غیاب عوامل جاذب مانند EDTA هیدرولیز می‌شود. RNA تهیه شده به عنوان الگو در واکنش پلی مرز معکوس (RT) استفاده شد.

واکنش پلی مرز معکوس

روش کار

۱- در یک لوله فاقد RNase ، ۰/۵ میکرو گرم از RNA با ۰/۵ میکرولیتر الیگو dT مخلوط شد و با آب DEPC خورده به حجم ۱۱ میکرولیتر رسانده شد.

¹ Optical density

۲- مخلوط فوق در ۷۰ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس فوراً بر روی یخ منتقل شد تا ساختارهای ثانویه RNA از هم باز شده و فرصت کافی برای فولد شدن مجدد نداشته باشند.

۳- به مخلوط فوق بافر X۵ به میزان ۴ میکرولیتر، dNTP (۱۰Mm) به میزان ۲ میکرو لیتر و (RNasinRibonuclease Inhibitor) به میزان ۲۰ واحد افزوده و حجم کل به ۱۹ میکرو لیتر رسانده شد.

۴- مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و سپس به آن ۲۰۰ واحد از آنزیم RT اضافه شد.

۵- مخلوط فوق به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

۶- به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت که سبب غیرفعال شدن آنزیم گردید، سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. محصول cDNA به دست آمده در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

انجام PCR بر روی cDNA تهیه شده

روش کار

جهت اطمینان از یکسان بودن کلیه ترکیبات در همه تیوبهای PCR، در هر سری انجام واکنش، یک محلول اصلی از کلیه ترکیبات مورد استفاده در PCR به غیر از پرایمرها و cDNA به صورت زیر ساخته شد. مواد زیر برای واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر مناسب است.

DNA الگو ۱ μl / μg (cDNA) ۲ میکرولیتر به ازاء هر تیوب

PCR master mix X 2 ۱۲/۵ میکرولیتر به ازاء هر تیوب

پرایمر فوروارد (100 pM) 0/5 میکرولیتر به ازاء هر تیوب

پرایمر ریورز (100 pM) 0/5 میکرولیتر به ازاء هر تیوب

-آب دیونیزه به میزانی که حجم هر تیوب در این مرحله به 25 میکرولیتر برسد. سپس در دستگاه Thermal cycler قرار داده شد.

واکنش در دستگاه Thermal cycler صورت گرفت. مراحل انجام واکنش به صورت زیر بود.

مراحل دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
واسرشتگی اولیه 94	5 دقیقه	1
واسرشتگی 94	30 ثانیه	35
جفت شدن شیب دمایی	45 ثانیه	35
کشیدگی 72	40 ثانیه	35
کشیدگی نهایی 72	5 دقیقه	1

لازم به توضیح است که در هر بار انجام PCR یک کنترل داخلی و یک نمونه بلانک یا شاهد (

NTC) نیز به کار گرفته شد. در تیوب شاهد به جای cDNA ، 2 میکرولیتر آب افزوده شد تا از عدم آلودگی نمونه‌ها اطمینان حاصل شود.

پس از پایان واکنش PCR، حدود 6 میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز 1/5 درصد

الکتروفورز شد و بقیه محصول PCR در دمای C 20- نگهداری شد.

بررسی DNA استخراج شده در ژل آگاروز

قطعات DNA در ژل آگاروز براساس اندازه، وزن و شکل فضایی از هم جدا شده و به دلیل داشتن بار منفی تحت جریان الکتریکی از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. درصد ژل مورد استفاده بر مبنای اندازه DNA در نظر گرفته می‌شود. در این آزمایش از ژل آگاروز ۱/۵ درصد، استفاده شد. هرچه میزان اندازه DNA بزرگتر باشد درصد ژل نیز کمتر خواهد شد.

روش تهیه محلول‌ها

بافر (TBE ۱۰X)

۱۰۸ گرم تریس

۵۵ گرم بوریک اسید

۴۰ میلی لیتر EDTA (PH=۸) ۰/۵ مولار

تریس باز و اسید بوریک در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و سپس EDTA ، ۰/۵ مولار به آن اضافه و حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد. این محلول در دمای اتاق نگهداری گردید.

روش کار

۱- ۰/۷۵ گرم پودر آگاروز، در ۵۰ میلی لیتر بافر TBE ۱X (برای قطعات زیر ۱۰۰۰ باز) و یا ۱X TAE (برای قطعات بیش از ۱۰۰۰ باز) به وسیله حرارت مایکرو ویو کاملاً حل شد تا شفاف گردید.

۲- سپس هنگامی که کمی سرد شد (دمای ۶۰ درجه سانتی گراد)، به میزان ۲ میکرولیتر اتیديوم بروماید به آن اضافه شد. سینی مخصوص ژل با شانه ی مناسب آماده و ژل به آن اضافه شد (ضخامت ژل در حدود ۵ میلی متر است)، فرصت داده شد تا ژل در دمای اتاق کاملاً سفت گردید.

۳- پس از بستن ژل، شانه از آن خارج شده، ژل تهیه شده درون تانک الکتروفورز حاوی بافر X ۱ TBE قرار داده شد.

۴- مقدار ۶ میکرولیتر از نمونه DNA خالص شده با ۱ میکرولیتر بافر نمونه گذاری (Fermentas) خوب مخلوط و درون چاهک ژل منتقل گردید.

نمونه‌ها با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند (به ازای هر سانتی‌متر ژل ۱۰-۵ ولت در نظر گرفته می شود)، هنگامی که خط رنگ محلول نمونه‌گذاری، دو سوم طول ژل را پیمود، دستگاه مولد برق خاموش و ژل از تانک خارج گردید و در دستگاه (Gel Documentation Uvtec D55, France)، با استفاده از طول موج کوتاه UV بررسی شد.

فصل چهارم

نتایج و یافته ها

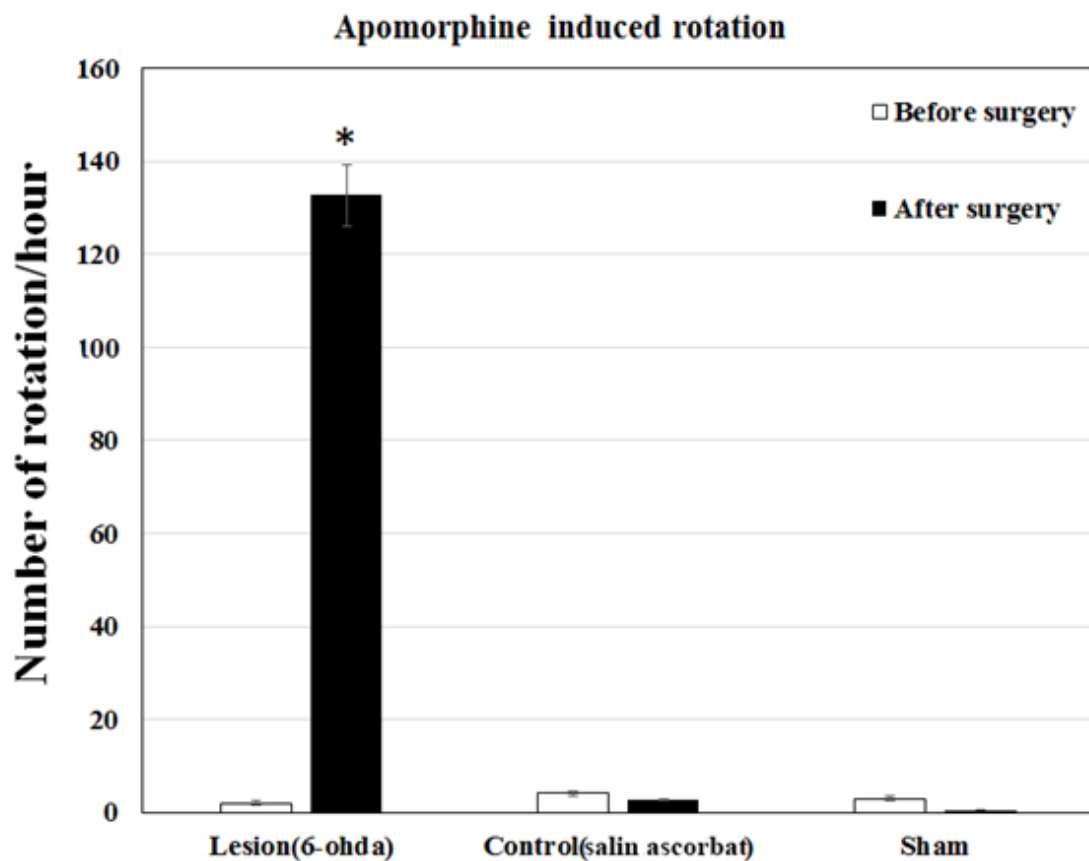
نتایج

در این فصل به نتایج حاصل از بررسی بیان ژن p62 و ژن های اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون در موش صحرایی نژاد ویستار اشاره می گردد. در این تحقیق جهت ایجاد مدل پارکینسونی، رفتار

چرخشی حیوان (تعداد دفعات چرخش در طی یکساعت) به دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید (آگونیزست دوپامینرژیک) در هفته قبل از عمل جراحی و چهار هفته بعد از عمل جراحی به دنبال تزریق 6-OHDA و اسید اسکوربیک ۰/۲٪ در گروه تخریب و همچنین رفتار چرخشی حیوان (تعداد دفعات چرخش در طی یکساعت) به دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید (آگونیزست دوپامینرژیک) در هفته قبل از عمل جراحی و چهار هفته بعد از عمل جراحی به دنبال تزریق محلول نرمال سالین ۰/۹٪ حاوی اسید اسکوربیک ۰/۲٪ در گروه شم بررسی گردید.

۴-۱. بررسی رفتار چرخشی

در این قسمت، تعداد دفعات چرخش القاء شده به دنبال تزریق داخل صفاقی داروی آپومورفین یک هفته قبل از جراحی و چهار هفته بعد از جراحی در سه گروه تخریب، شم و کنترل مورد بررسی قرار گرفت. تعداد دفعات چرخش القا شده به دنبال تزریق داخل صفاقی داروی آپومورفین یک هفته قبل از جراحی، هیچ گونه اختلاف معنی دار بین گروه ها مشاهده نشد (نمودار ۱). موش های گروه تخریب، پس از ۴ هفته، به دنبال تزریق آپومورفین تعداد چرخش کونترولترال معنی دار ($p < 0/05$) نسبت به دو گروه کنترل بدون تزریق و گروه شم با تزریق سالین آسکوربات نشان دادند و میانگین چرخش حیوانات در گروه تخریب ۱۳۲/۷۵ بود که اختلاف معنی داری را نسبت به دو گروه دیگر نشان داده است که بیانگر ایجاد صحیح مدل بیماری بوده است.



نمودار ۱. تعداد کل دفعات چرخش در طی یک ساعت را بر اثر تزریق آپومورفین در هفته قبل و چهار هفته بعد از جراحی را نشان می‌دهد. تعداد دفعات چرخش القا شده در چهار هفته پس از جراحی در مقایسه بایک هفته قبل از جراحی، هیچ‌گونه اختلاف معنی دار بین دو گروه کنترل و شم مشاهده نشد. در گروه تخریب، چهار هفته بعد از جراحی تعداد چرخش کونترولترال معنی دار ($p < 0/05$) نسبت به هفته ی قبل از جراحی نشان دادند.

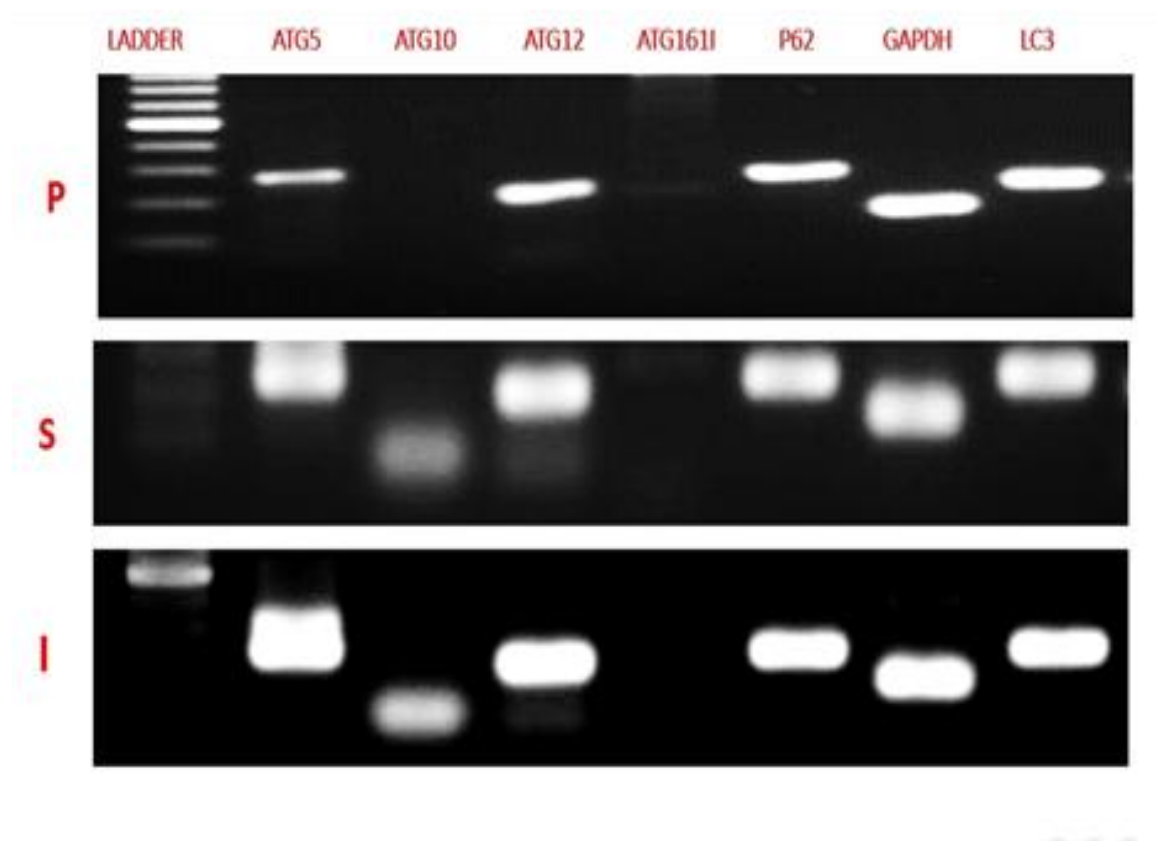
Lesion = گروه تخریب

Sham = گروه شم

Control = گروه کنترل

۲-۴. بررسی بیان ژن ها به روش RT-PCR

در بررسی بیان ژن ها، ژن های LC3، Atg10، Atg16L، Atg12، Atg5، P62 و GAPDH در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی و نیز در گروه کنترل و شم به روش RT-PCR مشاهده شد که ژن های LC3، Atg12، Atg5، P62 و GAPDH در مدل بیماری پارکینسون بیان شدند، اما ژن های Atg10 و Atg16L1 بیان نشدند. ژن Atg10 در گروه های کنترل و شم بیان شد در حالی که ژن ATG16L1 بیان نشد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفوروگرام سلول‌های جسم سیاه. الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA ژن‌های ATG5، ATG10، ATG12، ATG16L1، LC3، GAPDH، P62 در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی، گروه کنترل و شم. ژن‌های ATG5، P62، LC3، ATG12 در مدل بیماری پارکینسون بیان شدند، اما ژن‌های ATG10 و ATG16L1 بیان نشدند.

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵-۱. بحث

بیماری پارکینسون دومین اختلال رایج نورودژنراتیو می‌باشد. در طی دو دهه ی اخیر پیشرفت‌های زیادی در جهت شناخت پاتوژنز بیماری پارکینسون انجام شده که نتیجه آن کشف جهش‌های ژنی است که در شروع بیماری پارکینسون دخالت دارد. اخیرا اختلال در مسیر اتوفاژی در مغز بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون و مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون مشاهده شده است که نقش اتوفاژی را در بیماری پارکینسون نشان می‌دهد [۵].

برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون در سال‌های اخیر از سم 6-OHDA استفاده می‌شود که به صورت داخل استریاتال تزریق می‌شود. به دنبال تزریق 6-OHDA به داخل استریاتوم کاهش دراز مدت، پایدار و بارز تعداد نورون‌ها در جسم سیاه همان طرف رخ می‌دهد (اثر رتروگرا). 6-OHDA توسط نورون‌های جسم سیاه همانند دوپامین شناخته شده و در داخل سلول‌ها به صورت گرانولار ذخیره و سپس به سلول باند و با تحریک عصبی آزاد می‌گردد، در نتیجه به عنوان یک نوروترانسمیتر کاذب عمل می‌کند. میزان بالای تجمع سیتوپلاسمی آن باعث تولید میزان بالایی از محصولات 6-OHDA مثل پراکسیدها، سوپر اکسیدها و کوبونون ها^۱ شده که این فرآورده‌ها باعث تخریب نورونی می‌شوند. شبکه آندوپلاسمی خشن، غشای سلولی، هسته و میتوکندری اولین محل‌هایی هستند که توسط 6-OHDA آسیب می‌بینند. این سم در میتوکندری موجب مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شود. این سم در CNS حیوانات تغییراتی در نورون‌های دوپامینرژیک و مونوآمینرژیک ایجاد می‌کند. ذخایر دوپامین به صورت اولیه پس از تزریق افزایش می‌یابد ولی سپس میزان آن پس از آسیب‌های متوالی به نورون‌های دوپامینی کاهش یافته و تمام می‌شود. نوروتوکسین 6-OHDA از طریق القاء تولید آب اکسیژنه و رادیکال‌های آزاد و بسیار فعال هیدروکسیل مشتق از آن و احتمالا در حضور

¹ quinons

آهن موجب آسیب مسیر دوپامینرژیک نیگرو استریاتال می‌گردد[۵۴]. در این تحقیق به میزان ۱۲/۵ میکروگرم از سم 6-OHDA در ۵ میکرولیتر محلول سالین آسکوربات به داخل استریاتال در سمت چپ برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون بر روی موش‌ها تزریق شد که نوروهای دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه به صورت ناقص از بین می‌روند که بسیار شبیه به شروع بیماری پارکینسون در انسان است.

با تزریق یک طرفه 6-OHDA به داخل استریاتوم موش صحرایی بخش اعظم نوروهای دوپامینرژیک از بین رفته و در نتیجه کاهش سطح دوپامین در استریاتوم همان طرف ضایعه ایجاد می‌گردد. این تغییرات یک طرفه باعث ایجاد عدم تقارن حرکتی می‌شود که با استفاده از آگونیست‌های مستقیم دوپامینرژیک نظیر آپومورفین که مستقیماً بر روی گیرنده اثر می‌کند به طور کمی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. آپومورفین باعث القاء چرخش به سمت راست در حیوانات با تخریب طرف چپ استریاتوم می‌گردد[۵۵]. در این تحقیق پس از ۴ هفته تعداد چرخش به سمت راست موش‌های صحرایی گروه تخریب که به پارکینسون مبتلا شده بودند به دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین بسیار قابل ملاحظه نسبت به دو گروه کنترل بدون تزریق و گروه شم با تزریق سالین آسکوربات بود نشان دهنده پارکینسونی شدن این موش‌های صحرایی و تخریب سیستم نیگرا استریاتال آن‌ها بود.

در بررسی بیان ژن‌ها، ژن‌های LC3، Atg10، Atg16L، Atg12، Atg5، P62 و GAPDH در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی و نیز در گروه کنترل و شم به روش RT-PCR مشاهده شد که ژن‌های Atg10، Atg12، Atg5، P62 و LC3 و GAPDH در مدل بیماری پارکینسون بیان شدند، اما ژن‌های Atg10 و Atg16L1 بیان نشدند. ژن Atg10 در گروه‌های کنترل و شم بیان شد در حالی که ژن Atg16L1 بیان نشد.

P62/ SQSTM1/A170 یک پروتئین داخل سلولی است که در اثر استرس القاء شده و در تنظیم مسیرهای انتقال سیگنال‌های مختلف درگیر در بقای سلولی و مرگ سلول نقش مهمی دارد. P62 فعالیت mTORC1 را تقویت می‌کند و باعث مهار اتوفاژی می‌شود. P62 این کار را با اتصال به mTORC1 و فسفریله کردن ULK1/2 انجام می‌دهد. بنابراین کاهش P62 باعث غیر فعال شدن mTORC1 و فعال شدن اتوفاژی می‌شود [۵۷]. P62 پروتئین‌های یوبی کوئیتینه شده را برای تجزیه از طریق اتوفاژی به LC3 متصل می‌کند [۵۹]. وقتی اتوفاژی بلاک می‌شود تجمع P62 بالا می‌رود و بنابراین به عنوان مارکر اتوفاژی استفاده می‌شود [۶۰]. P62 یک پروتئین متصل شونده به یوبی کوئیتین است که با LC3 برهم کنش می‌کند و نقشی در انتقال محموله اتوفاژیک به فاگوفور بازی می‌کند [۶۰]. P62 برای تجمع پروتئین‌های یوبی کوئیتینه شده نیاز است و بنابراین نقش حیاتی برای پاکسازی اتوفاژیک آن‌ها بازی می‌کند. P62 باعث آزاد سازی Beclin1 به وسیله ی گسیختن اتصال Beclin1 و BCL2 می‌شود و بنابراین ممکن است به طور مثبت القای اتوفاژی را تنظیم کند [۶۰].

مطالعات نشان دادند که در بیماری آلزایمر، پروتئین P62 از نوروفیبریلاتوری که عمدتاً از پروتئین تاو هیپر فسفولیپیدی و یوبی کوئیتین تشکیل شده است. شواهد نشان می‌دهد که P62 نقش مهمی در تخریب پروتئین تاو به عهده دارد. مطالعات اخیر نشان داده اند که بیان ژن P62 و سطوح پروتئین P62 سیتوپلاسمی به میزان قابل توجهی در قشر پیشانی بیماران آلزایمر کاهش می‌یابد. کاهش سطح پروتئین P62 باعث افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال بقای نورون‌ها شود [۶۱].

مطالعات اخیر نشان داده است که بیماری پریون اختلالات عصبی کشنده در ارتباط با تبدیل کنفورماسیونی پروتئین نرمال سلولی پریون به پروتئین بیماری زا پریون می‌باشد. در این تحقیق گزارش شده است که تخریب پروتئین‌های بیماری زای پریون توسط فعال کردن اتوفاژی انجام می‌شود و بیان

p62 تجمع پروتئین های بیماری زای پریون را کاهش می دهد و یک گزینه درمانی برای این بیماری می باشد [۶۲].

در بیماری پارکینسون تجمع پروتئین های یوبی کوئیتینه رخ می دهد و بیان P62 نیز نشان می دهد که بیان این ژن در تجمع پروتئین ها در پارکینسون می تواند نقش داشته باشد و نقشی در پاکسازی آن ها از طریق اتوفاژی ایفا می کند. بیان LC3 در این بررسی هم نشان می دهد که P62 در پارکینسون می تواند با LC3 بر هم کنش کند و در انتقال محموله اتوفاژیک به فاگوفور بازی کند.

در این بررسی دو ژن Atg5 و Atg12 بیان شدند، پس تبدیل LC3 به LC3 II ممکن است اتفاق افتد. مطالعات اخیر نشان داده است که LC3 I تحت تاثیر محرومیت غذایی، کاهش اکسیژن و شیمی درمانی به LC3 II تبدیل می شود که در غشای اتوفاگوزوم قرار می گیرد. در نتیجه LC3 II در سلول القاء اتوفاژی را منجر می شود. ژن LC3 در مرحله elongation در اتوفاژی دخیل است. این ژن در هر سه گروه رت ها بیان شد و بیان ژن LC3 نشان دهنده این است که ممکن است انتقال محموله به اتوفاگوزوم در بیماری پارکینسون اتفاق افتد .

در طول elongation ، کونجوگه ی Atg8- PE بر روی غشای فاگوفور قرار می گیرد و در انتقال محموله به اتوفاگوزوم شرکت می کند. Atg12 یک پروتئین با ۱۸۶ آمینواسید است که با Atg5 کونژوگه می شود. گلايسين در زنجيره انتهایی کربوکسی Atg12 به وسیله (E1 like enzyme) Atg7 از طریق پیوند پر انرژی وابسته به ATP فعال می شود. Atg12 به (E2 like enzyme) Atg10 منتقل می شود و به لیزین ۱۴۹ Atg5 متصل می شود. کونژوگه Atg5-Atg12 برای شکل گیری کمپلکس Atg5-Atg12-Atg16L1 با Atg16L1 تعامل می کند. سیستم کونژوگه یوبی کوئیتین Atg16L1-Atg5-Atg12 می باشد که برای شکل گیری اتوفاگوزوم اولیه

ضروری می‌باشد.

Atg10 یک آنزیم شبیه E2 است که در شکل‌گیری اتوفاگوزوم شرکت می‌کند. Atg10 با Atg7 برای دریافت Atg12 که یک مولکول یوبیکوئیتین است تعامل می‌کند که در واکنش کونژوگه-Atg5-Atg12 شرکت می‌کند و در شکل‌گیری اتوفاگوزوم دخالت می‌کند [۱۷]. Nemoto و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که Atg10 یک آنزیم E2- Like که در دو فرآیند اصلاحی کونژوگه Atg 5-Atg 12 و تغییر فرم LC3 در اتصال به غشا برای شکل‌گیری اتوفاگوزوم شرکت می‌کند.

مطالعات اخیر نشان داده است که بیان ژن Atg10 در ارتباط با متاستاز گره لنفاوی و عروقی لنفاوی در سرطان رکتال می‌باشد. این مطالعات نشان داده است که خود تنظیمی منفی ژن‌های Atg، در توسعه تومور به صورت مستقیم و غیر مستقیم دخالت می‌کند. کاهش میزان اتوفاژی التهاب وابسته به نکروز و توسعه تومور را افزایش می‌دهد. با این حال، مطالعات دیگر نشان داده اند که افزایش اتوفاژی می‌تواند به توسعه تومور کمک کند. در واقع اتوفاژی بقای سلول را با تنظیم تعادل متابولیک ترویج می‌دهد. بنابراین، اتوفاژی می‌تواند تومور و متاستاز را با افزایش بقای سلول‌های تومور افزایش دهد [۶۳].

در این یافته، ژن Atg10 بیان نشد، پس Atg5 و Atg12 نمی‌توانند به هم متصل شوند. انتقال LC3 از Atg8 به PE توسط کمپلکس Atg5-Atg12-Atg16L1 تحریک می‌شود که همچنین محل تولید LC3-PE را تعیین می‌کند.

در مطالعه ای دیگر نشان داده شده است که بیان ژن اتوفاژی Atg5 منجر به بقاء و تکثیر سلول‌های T می‌شود. ارتباط قوی بین بیان ژن Atg5 و اختلالات حرکتی در بیماران مبتلا به MS وجود دارد. بیماری مولیپتل اسکروزیس بیماری التهاب در سیستم عصبی مرکزی است که با دمیالینه شدن سلول‌های T همراه است. در این بیماری افزایش در تعداد و بقاء سلول‌های T با پیشرفت بیماری مرتبط است.

Atg16L1 نقش اساسی در اتوفاژی بازی می‌کند. تعامل Atg16L1 با Atg5-Atg12 واسطه ی کونژوگه فسفاتیدیل اتانل آمین با LC3 ، باعث تولید شکل فعال LC3 به LC3 II می‌شود و در نتیجه گسترش غشای اتوفاگوزوم را کنترل می‌کند. Atg16/Atg16L1 برای اتوفاژی ضروری است زیرا لوکالیزاسیون کونژوگه ی Atg5-Atg12 را به PAS در مخمر تنظیم می‌کند. Atg16L1 همچنین با FIP200 برهم کنش می‌کند و منجر به هدف‌گذاری صحیح کمپلکس Atg16L1 به محل تشکیل اتوفاگوزوم می‌شود و در سلول هایی که از FIP200 تخلیه شده اند، رنگ آمیزی Atg16L1 یک الگوی سیتوپلاسمی پراکنده را نشان می‌دهد [۶۴].

Hampe J و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که بیان ژن اتوفاژی Atg16L1 ریسک فاکتوری در پیشرفت بیماری کرون می باشد. کمبود Atg16L1 در سلول ها که باعث تجمع میکروبهای درون سلولی، مانند سالمونلا و شیگلا می‌شود. در طول زمان نشان می‌دهد که Atg16L1 تکثیر میکروبهای داخل سلولی را متوقف می‌کند که نقش Atg16L1 در تشکیل غشا اطراف میکروبه‌ها در فرآیند تخریب اتوفاژی همراه با LC3 را نشان می‌دهد.

در مطالعه ای ثابت شده است که اکثر موش‌هایی که از نظر داشتن Atg16L1 نقص داشتند یک روز بعد از تولد مردند که نشان دهنده ی اینست که Atg16L1 برای بقا در طول گرسنگی نوزاد (neonatal starvation) ضروری است. در این موش‌ها اتصال LC3 به PE به ندرت مشاهده می‌شود [۶۴]. در فیبروبلاست موش‌هایی که نقص در داشتن Atg16L1 داشتند، کمپلکس Atg5-Atg12 به ندرت مشاهده می‌شود و اتوفاگوزوم ها نمی‌توانند تشکیل شوند و این منجر به تجمع پروتئین‌های با عمر طولانی و تجمع P62/SQSTM1 می‌شود [۶۵].

۵-۲. نتیجه گیری

تمام این موارد نشان می‌دهد که اتوفاژی یک نقش حیاتی در بیماری پارکینسون بازی می‌کند و عدم تنظیم آن منجر به ایجاد بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های نورو دژنراتیو می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که Atg10 برای اتوفاژی با تنظیم لوکالیزاسیون Atg5-Atg12 اساساً ضروری است. عدم بیان ژن Atg10 و Atg16L1 نشان می‌دهد که LC3 به PE نمی‌تواند متصل شود و اتوفاژی در طول elongation ناقص است و از تنظیم خارج شده است، اما بیان ژن‌های دیگر در حیوانات گروه کنترل و شم نشان می‌دهد که احتمالاً اتوفاژی در این دو گروه رخ داده است. کشف راه کارهای درمانی که اتوفاژی را به میزان صحیح تنظیم نمایند می‌تواند منجر به ایجاد پیشرفت‌هایی در جهت کاهش تجمع پروتئین‌ها در سلول و جلوگیری از مرگ نورون‌ها شود و نورودژنراسیون را به تاخیر بیندازد.

۵-۳. پیشنهادات

۱- بررسی تغییرات بافتی سیستم نیگرواستریاتال در مدل تجربی پارکینسون با استفاده از تکنیک

ایمونوهیستوشیمی.

۲- بررسی اثر میزان دوپامین در استریاتوم بعد از آزمون های رفتاری.

۳- در صورت مثبت بودن نتایج تکرار آزمایش در دیگر مدل های حیوانی پارکینسون توصیه می گردد.

1. Schulte C, Gasser T. Genetic basis of Parkinson's disease, inheritance, expression. *Journal Dore press*.2011; 4:67-80.
2. Willis AW, Sterling C, and Racette BA. Conjugal Parkinsonism, A case series with environmental risk factor analysis. *Parkinsonism Relat Disord*. Mar 2010; 16(3): 163-166.
3. Dias V, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*.2013; 3(4): 461–491.
4. Schapria Ah, Jennar p. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*.2011 May; 26(6):1049-55.
5. Manley S,Williams JA, Ding WX.The Role of p62/SQSTM1 in Liver Physiology and Pathogenesis.*Biol med*.May 2013; 238(5) 525-538.
6. Smith Y, WichmannT. Parkinson's disease Therapeutics: New Developments and Challenges since the Introduction of Levodopa. *Neuropsychopharmacology*. Jan 2012; 37(1): 213–246.
7. Czaja MJ, Ding WX,Donohue TM Jr, Friedman SL, Kim JS,Komatsu M,Lemasters JJ,Lemoine A, Lin JD,Ou JH,Perlmutter DH, Randall G,Ray RB,Tsung A,Yin XM. Function autophagy in normal and diseased liver.May 2013; 10:1131-1158.
8. Matsuda N, Tanaka K. Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease? *J. Alzheimers Dis*.2010; 19:1-9.
9. Burchell VS, Gandhi S, Deas E,Wood NW, Abramov AY, Plun-Favreau H. Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: Part II. *Expert Opin. Ther. Targets*.2010; 14:497-511.
10. Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW. PINK1 function in health and disease. *EMBO Mol. Med*.2009; 1:152-165.
11. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*.2009; 137:1001-4.

12. Du Y, Wooten MC, Wooten MW. Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease *Neurobiol Dis.* 2009; 35(2): 302-310.
13. Pyo JO, Jang MH, Kwon YK and Lee HJ. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem.* May 2005; 280 (21): 20722-9.
14. Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The Autophagy Protein Atg12 Associates with Antiapoptotic Bcl-2 Family Members to Promote Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell.* 2011; 44 (2011): 698-709.
15. Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells. *semin Immunopathol* 2010; 32: 397-413.
16. Orsi A, Polson HE and Tooze SA. Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* Apr 2010; 22 (2): 150-6.
17. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLOS Biology.* 2010; 8 (1):10-15.
18. De Rijk MC, Launer LJ, Berger K. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology.* 2000; 54(11):21-23.
19. Fearnley J M, Lees AJ. Aging and Parkinson's diseases: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991; 114: 2283-2301.
20. Marsden CD. Problems with long-term levodopa therapy for Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* 1994; 17: 32-44.
21. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011; 26:1-58.
22. Liu R, Guo X, Park Y, Huang X, Sinha R, Freedman ND. Caffeine Intake, Smoking, and Risk of Parkinson Disease in Men and Women. *Am J Epidemiol.* 2012 Jun; 175(11):1200-7.

23. Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW. Permanent human Parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*. 1985 Jul. 35(7):949-56.
24. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998 Feb. 18(2):106-8.
25. Ebadi M, Srinivasan, SK and Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 1996 Jan; 48(1):1-19.
26. Olanow CW. Oxidation reaction in Parkinson's disease. *Neurology*. 1990 40(10): 32-7.
27. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *arch Biochem biophys.* 1990; 280(1):1-8.
28. Harrison DE, Strong R, Sharp ZE, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460(7253):392-5.
29. Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 2005; 12 (2) 1535-1541.
30. Tolosa E, Jankovic JJ. Parkinson's disease and movement disorders. Hagerstown, MD. 2007; 12(1): 83-271
31. Davie CA. A review of Parkinson's disease. *Br. Med.* 2008; 86 (1): 109-27.
32. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 2008; 79 (4): 368-376.
33. King LA, Horak FB. Delaying Mobility Disability in People with Parkinson Disease Using a Sensorimotor Agility Exercise Program. *Phys Ther.* 2009 Apr; 89(4): 384–393
34. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004 May 29; 363(9423):1783-93.

35. Caballol N, Martí MJ, Tolosa E. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease. *Mov Disord*. 2007 Sep; 22(17): 358-66.
36. National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK). Parkinson's disease: National Clinical Guideline for Diagnosis and Management in Primary and Secondary Care. London: Royal College of Physicians (UK); 2006. (NICE Clinical Guidelines, No. 35.) Guideline Development Group members.
37. Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues *Arch. Neurol*. 2006; 68 (2): 165.
38. Hooper, Amanda K, Okun, Michael S.; Foote, Kelly D.; Fernandez, Hubert H, Jacobson C, Zeilman P, Romrell J, Rodriguez RL. Clinical Cases where Lesion Therapy Was Chosen over Deep Brain Stimulation. *Stereotactic and Functional Neurosurgery* .2008; 86 (3): 147–52.
39. John E. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
40. Stocco A, Lebiere C, Anderson JR. Conditional Routing of Information to the Cortex: A Model of the Basal Ganglia's Role in Cognitive Coordination. *Psychological Review*. 2010; 117 (2): 541-74.
41. Carr JH, Shepherd RB. *Neurological Rehabilitation: Optimizing Motor Performance*. 1998;
42. Youdim MBH, Riederer p. understanding Parkinson's disease. *Scientific American*. 1997; 276:52-59.
43. Gerlach M, Riederer p. animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of neural transmission* .1996; 103(8) 987-1041.
44. Gasen M, Youdim M .free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance: springer. 1999; 193-210.

45. J. M Rabey, F. Hefti. Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *Journal of Neural Transmission*.1990; 2 (1): 1-14.
46. Kim SJ, Sung JY, Um JW, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, Paik SR, Kim J, Chung KC. Parkin Cleaves Intracellular α -Synuclein Inclusions via the Activation of Calpain. *Journal of Biological Chemistry*.2003; 278 (43): 41890-9.
47. Gelorc L, Bezin L, Foster JA, Jiang H, Jackson TS, Weissmann D. lipid peroxidation-mediated oxidative stress and dopamine neuronal apoptosis in the substantia nigra during development. *neurochemistry international*.2001;39(2): 127-33.
48. Parent A, Cote PY, Lavoie B. Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog Neurobiol*.1995 ;(46)131-197.
49. Lodish H, Berk A, Zipursky SL. Neurotransmitters, Synapses, and Impulse Transmission. *Molecular Cell Biology*.2000 (4).
50. Pretson RJ, Mccrea RA, Chang HT, Kitai ST. Anatomy and physiology of substantia Nigra and Retrobulbar neuron studied by Extra And Intra cellular recording and by Horseradish peroxidase Labeling. *Neurosci*.1981; 331-344.
51. Kaakkola S, and teravainen H. Animal model of Parkinsonism, pharmacology and toxicology.1990; (67):95-100.
52. Gerach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with phenomenology of the disease in man., *J. neural transmission*.1996; 103(8):987-1041.
53. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*.2011 Oct; 164(4): 1357–1391.
54. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioassays*. 2002; 22(4):18-308.
55. Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 2007, 11(3, 4): 151-167.

56. Glinka Y, Gassen M, Youdim MB. Mechanism of 6-Hydroxydopamine neurotoxicity. *Advances in Research on neurodegeneration*. 1997; 55-66.
57. Pyo J, Nah J, Jung Y. Molecules and Their function in autophagy, *Experimental and molecular medicine* 2012.44(2): 73-80.
58. Moscat J, Diaz-Meco MT. P62 at the crossroads of autophagy, Apoptosis and cancer. *2004 ;(6):303-309*.
59. Lynch-Day M, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(4):a009357.
60. Lippai M, Löw P. The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Research International*. 2014; 2014 (2014).
61. Antero Salminen, Kai Kaarniranta, Annakaisa Haapasalo, Mikko Hiltunen, Hilka Soininen. Emerging role of p62/sequestosome-1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 2012; 96:87–95
62. Takujiro Homma, Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Katsuya Satoh, Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Scientific Reports*, 2014;4504.
63. Yoon Kyung Jo, Seung Cheol Kim, In Ja Park, So Jung Park. Increased Expression of ATG10 in Colorectal Cancer Is Associated with Lymphovascular Invasion and Lymph Node Metastasis. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52705.
64. Tatsuya S, Shizuo A. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*. 2008; 456: 264-268.
65. Zavodszky E, Vicinanza M, Rubinsztein D. Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. *FEBS letters*. 2013; 587(13): 1988–1996

Abastact

Background: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder associated with extensive degeneration of the dopaminergic neurons in substantia nigra. Oxidative stress destructs the organelles, where autophagy is a mechanism disassembling the damaged organelles from the cell. This study to determine the P62 gene expression and autophagy genes involved in the cell signaling pathway includes Atg5, Atg12, Atg16L1, Atg10, GAPDH, LC3 is in an animal model of Parkinson's disease.

METHODS: Male Wistar rats were divided in to three groups of control, Sham and lesion. The lesion was induced by injecting 6-OHDA in the left striatum. The Behavioral test was conducted through apomorphine hydrochloride one week (base line) and four weeks after surgery. After confirmation of the disease, the substantia nigra in the brain stem animals were removed in order to perform RT-PCR on genes P62, Atg5, Atg10, Atg12, Atg16L1, LC3 and GAPDH.

Results: In behavioral test, the average rotation was 132/75 that indicated the animal model of Parkinson's disease was correct. It was revealed that P62, Atg5, Atg12, LC3 and GAPDH were expressed in Parkinson's disease, while Atg16L1 and Atg10 were not expressed.

Keywords: Parkinson's disease, autophagy, oxidative stress, 6-hydroxy-dopamine, rats, apomorphine.

